Supplemento ordinario alla "Gazzetta Ufficiale" n. 38 del 15 febbraio 1990 - Serie generale

Spedizione in abbonamento postale - Gruppo I (70%)

GAZZETTA UFFICIALE
DELLA REPUBBLICA ITALIANA

PARTE PRIMA **Roma - Giovedì, 15 febbraio 1990** SI PUBBLICA TUTTI I GIORNI NON FESTIVI

DIREZIONE E REDAZIONE PRESSO IL MINISTERO DI GRAZIA E GIUSTIZIA - UFFICIO PUBBLICAZIONE LEGGI E DECRETI - VIA ARENULA 70 - 00100 ROMA
AMMINISTRAZIONE PRESSO L'ISTITUTO POLIGRAFICO E ZECCA DELLO STATO - LIBRERIA DELLO STATO - PIAZZA G. VERDI 10 - 00100 ROMA - CENTRALINO 85081

N. 10

MINISTERO DELLA SANITÀ

DECRETO MINISTERIALE 20 dicembre 1989.

Modificazioni ed integrazioni ai decreti ministeriali 3 dicembre 1985 e 25 luglio 1987, n. 555, sulla classificazione e la disciplina dell'imballaggio e dell'etichettatura delle sostanze pericolose, in attuazione delle direttive emanate dal Consiglio e dalla Commissione delle Comunità europee.

SOMMARIO

MINISTERO DELLA SANITÀ

DECRETI, DELIBERE E ORDINANZE MINISTERIALI

MINISTERO DELLA SANITÀ

DECRETO 20 dicembre 1989.

Modificazioni ed integrazioni ai decreti ministeriali 3 dicembre 1985 e 25 luglio 1987, n. 555, sulla classificazione e la disciplina dell'imballaggio e dell'etichettatura delle sostanze pericolose, in attuazione delle direttive emanate dal Consiglio e dalla Commisssione delle Comunità europee.

IL MINISTRO DELLA SANITÀ

DI CONCERTO CON

I MINISTRI DELL'INTERNO DELL'INDUSTRIA, DEL COMMERCIO E DELL'ARTIGIANATO E DEL LAVORO E DELLA PREVIDENZA SOCIALE

Visto il decreto ministeriale 3 dicembre 1985;

Visto il decreto ministeriale 25 luglio 1987, n. 555;

Viste la direttiva del Consiglio n. 87/432 del 3 agosto 1987, le direttive della Commissione n. 87/302 del 18 novembre 1987 e n. 88/490 del 22 luglio 1988, che adeguano al progresso tecnico la direttiva n. 67/548 del Consiglio concernente il ravvicinamento delle disposizioni legislative, regolamentari ed amministrative relative alla classificazione, all'imballaggio ed alla etichettatura delle sostanze pericolose;

Ritenuto di dover integrare i decreti 3 dicembre 1985 e 25 luglio 1987, n. 555, in conformità delle citate direttive n. 87/432, n. 87/302 e n. 88/490;

Visti gli articoli 3 e 6 della legge 29 maggio 1974, n. 256, concernente la classificazione e disciplina dell'imballaggio e dell'etichettatura delle sostanze e dei preparati pericolosi;

Decreta:

Art. 1.

L'allegato I al presente decreto sostituisce ed integra ogni disposizione contenuta nell'allegato I al decreto ministeriale 25 luglio 1987, n. 555.

In tale nuovo allegato vengono individuate:

dal contrassegno (*), riportato sul margine sinistro, le sostanze che, già presenti nell'allegato I del decreto ministeriale 25 luglio 1987, n. 555, vengono modificate per quanto riguarda la denominazione, l'indicazione del CAS, la classificazione e l'etichettatura, nonché le sostanze che sono state inserite per la prima volta, in relazione alla direttiva del Consiglio n. 87/432/CEE;

dal contrassegno (**), riportato sul margine sinistro, le sostanze che, già presenti nell'allegato I del decreto ministeriale 25 luglio 1987, n. 555, vengono modificate per quanto riguarda la denominazione, l'indicazione del CAS, la classificazione e l'etichettatura, nonché le sostanze che sono state inserite per la prima volta, in relazione alla direttiva della Commissione n. 88/490/CEE.

Art. 2.

L'allegato II al presente decreto integra le disposizioni contenute nell'allegato V al decreto ministeriale 3 dicembre 1985, concernente i metodi sperimentali per la determinazione delle proprietà fisico-chimiche, tossicologiche ed ecotossicologiche, in relazione alla direttiva della Commissione n. 87/302.

Art. 3.

Il presente decreto si applica:

per le sostanze dell'allegato I contraddistinte dal contrassegno (**) a partire dal 1° luglio 1990;

per tutte le altre sostanze dell'allegato I, a partire dalla data di pubblicazione del presente decreto.

Per le sostanze ricomprese nell'allegato I, il termine di cui all'ultimo comma dell'art. 6 della legge 29 maggio 1974, n. 256, concernente lo smaltimento delle sostanze già immesse sul mercato, è fissato:

ad un anno dalla data di applicazione del presente decreto, limitatamente alle sostanze contraddistinte dal contrassegno (*);

al 1° luglio 1991, limitatamente alle sostanze contraddistinte dal contrassegno (**).

Art. 4.

Il presente decreto sarà pubblicato nella *Gazzetta Ufficiale* della Repubblica italiana.

Roma, addì 20 dicembre 1989

Il Ministro della sanità
DE LORENZO

Il Ministro dell'interno
GAVA

Il Ministro dell'industria, del commercio e dell'artigianato
BATTAGLIA

Il Ministro del lavoro e della previdenza sociale
DONAT CATTIN

ALLEGATO I

ELENCO DELLE SOSTANZE PERICOLOSE

Prefazione

Per consentire un'agevole consultazione dell'elenco delle sostanze pericolose, queste sono state sistemate in ordine alfabetico affiancando loro un numero d'ordine progressivo indicato nella prima colonna dell'allegato.

Qualora per una stessa sostanza sono riprese nell'elenco due o più denominazioni, solo in corrispondenza di una di esse sono riportate le indicazioni complete relative alla numerazione CEE, al numero CAS, alla classificazione e all'etichettatura, mentre l'altra o le altre si limitano ad un rinvio alla denominazione assunta come voce principale.

Nel caso di miscele, queste sono riportate nell'elenco sotto le singole sostanze, in modo che si possa giungere ad esse miscele a partire da qualsiasi componente.

La numerazione delle sostanze (N. CEE), riportata nella quinta colonna dell'allegato, è stata concepita per consentire aggiornamenti periodici dell'allegato I, senza apportare rilevanti modifiche alla sua presentazione. Essa è basata sull'impiego di una sequenza cifrata del tipo: ABC-RST-VW-Y in cui:

ABC rappresenta il numero atomico dell'elemento chimico più caratteristico preceduto da uno o due zeri per completare la sottosequenza, sia il numero convenzionale della classificazione prescelta per le sostanze organiche;

RST rappresenta il numero progressivo delle sostanze considerate nella sottosequenza ABC;

VW rappresenta, per la sostanza così definita, una delle forme in cui viene prodotta e/o immessa sul mercato;

Y rappresenta la cifra di controllo (check-digit) di tutta la precedente sequenza calcolata secondo il metodo utilizzato da ISBN (International Standard Book Number).

ABC-RST-VW-Y
n. 017-005-00-9

Il numero CAS (Chemical Abstract Service), riportato nella quarta colonna, permette d'identificare la sostanza. Le indicazioni che riguardano la classificazione o l'etichettatura della sostanza sono le seguenti:

a) il o i simboli ove previsti e l'indicazione di pericolo attribuiti in base all'allegato II (sesta colonna dell'allegato);

b) una serie di cifre precedute dalla R che indica la natura dei rischi particolari di cui all'allegato III (settima colonna dell'allegato);

c) una serie di cifre precedute dalla lettera S che indica i consigli di prudenza di cui all'allegato IV (ottava colonna dell'allegato).

Le cifre che seguono le lettere R e S sono separate o da un trattino orizzontale o da una barra obliqua, che hanno il seguente significato:

trattino orizzontale: enunciazione separata dei rischi particolari (R) o dei consigli di prudenza (S);

barra obliqua: enunciazione combinata possibile in una sola frase dei rischi particolari (R) o dei consigli di prudenza (S).

Le enunciazioni singole o combinate dei rischi particolari (R) figurano nell'allegato III e quelle dei consigli di prudenza (S) nell'allegato IV.

Per poter esprimere i requisiti di classificazione ed etichettatura in forma tabulare si è fatto ricorso, nel presente allegato per i simboli di pericolo, ad indicazioni sintetiche del tipo «T+» o «T» per le sostanze tossiche, «C» per le corrosive, «F+» o «F» per le infiammabili, «E» per le esplosive, «O» per le comburenti, «Xn» per le nocive, «Xi» per le irritanti, mentre per le frasi di rischio (R) ed i consigli di prudenza (S) sono stati riportati i rispettivi numeri d'ordine.

Sull'etichetta però, dovranno figurare il simbolo o i simboli rappresentati dalle illustrazioni e seguiti dall'indicazione di pericolo così come essi figurano negli allegati III e IV.

Si segnala infine, che nei casi specifici costituiti dai composti del cadmio e dai composti di antimonio il consiglio di prudenza S 22 si applica solo nei casi appropriati. Inoltre, nel caso specifico del sodio e del potassio il consiglio di prudenza S 5 non è richesto qualora venga utilizzato altro imballaggio di sicurezza.

Per snellire al massimo la formulazione delle sostanze di questo allegato sono state utilizzate diverse note di portata generale (nona colonna) di cui si riportano di seguito i testi esplicativi:

Nota *A*.

Il nome della sostanza deve figurare sull'etichetta sotto la denominazione, o una delle denominazioni, qualora ne sia indicata più d'una, di cui all'allegato I. Nell'allegato I, quando le sostanze di struttura analoga presentano gli stessi pericoli, è stata talvolta utilizzata la denominazione generale del tipo: «composti di...» o «sale di...». In tal caso, il fabbricante o qualsiasi persona che immette tale sostanza sul mercato è tenuta a precisare sull'etichetta il nome chimico corrispondente alla formula chimica:

Esempio:

Per B Cl: cloruro di berillio.

Nota *B*.

Talune sostanze (caso degli acidi, delle basi..., ecc.) vengono immesse sul mercato in soluzione acquosa a concentrazioni varie e necessitano dunque di un'etichettatura diversa poiché presentano rischi diversi. Nell'allegato I, viene utilizzata una denominazione generale del tipo:

«acido nitrico...%»

In tal caso, il fabbricante o qualsiasi altra persona che introduca tale sostanza nel mercato deve indicare sulla etichetta la concentrazione della soluzione in %.

Esempio:

«acido nitrico 45%»

L'espressione di % viene sempre intesa peso/peso salvo altra espressa specificazione. L'utilizzazione di altri dati (ad esempio, peso specifico, grado Beaumé...) o di frasi descrittive (ad esempio, concentrato, fumante, glaciale) puó essere tollerata.

Nota *C*.

Le sostanze organiche sono immesse sul mercato sia sotto forma isomerica ben definita, sia sotto forma di miscela di più isomeri.

Pertanto, nell'allegato I viene utilizzata una denominazione generale del tipo:

«Xilene»

In tal caso, il fabbricante o qualsiasi altra persona che immette tale sostanza sul mercato, deve specificare sull'etichetta che si tratta di un isomero ben definito o di una miscela di isomeri.

Esempi:

a) xilene orto;

b) xilene (miscela di isomeri).

Nota *D*.

Talune sostanze che sono suscettibili di polimerizzarsi o di decomporsi spontaneamente si riscontrano generalmente sul mercato sotto forma stabilizzata. È sotto questa forma che esse sono elencate nell'allegato I.

Tuttavia tali sostanze sono a volte immesse sul mercato sotto forma non stabilizzata. In questo caso, il fabbricante o qualsiasi altra persona che immette tali sostanze sul mercato deve specificare sull'etichetta il nome della sostanza seguito dalla dicitura: «non stabilizzata».

Esempio:

Acido metacrilico (non stabilizzato).

«Per quanto riguarda in particolare i sali (indipendentemente dalla denominazione utilizzata nell'allegato I) essi sono presi in considerazione sia nella forma anidra sia nella forma idrata, a meno che non venga espressamente specificato il contrario».

Nota *E*:

Per sostanze che figurano nella nota *E*, le frasi R20, R21, R22, R23, R24, R25, R26, R27 e R28 e tutte le combinazioni di queste frasi di rischio devono essere precedute dalla parola «anche».

Esempi:

R23: Anche tossicò per inalazione;

R27/28: Anche altamente tossico a contatto con la pelle e per ingestione.

Nota *F*:

Questa sostanza può contenere stabilizzanti. Se lo stabilizzante modifica le caratteristiche di pericolosità della sostanza, quali specificate dall'etichetta prevista conformemente all'allegato I, l'etichetta deve essere predisposta secondo le regole per l'etichettatura dei preparati pericolosi.

Numero d'ordine	SOSTANZA	Rif. sost.	CAS n.	N. CEE	CLASSIFICAZIONE ED ETICHETTATURA Simb.	R	S	Note
1	Acephate			015-079-00-7	Xn	20/21/22	2-13	
2	Acetaldeide		75-07-0	605-003-00-6	F+Xn	12-36/37-40	16-33-36/37	
	Acetale	n. 416						
3	Acetile cloruro		75-36-5	607-011-00-5	F-C	11-14-34	9-16-26	
4	Acetilene			601-015-00-0	F	5-6-12	9-16-33	
	Acetoncianidrina	n. 267						
5	Acetone		67-64-1	606-001-00-8	F	11	9-16-23-33	
6	Acetonitrile		75-05-8	608-001-3	F-T	11-23/24/25	16-27-44	
7	Acido acetico conc.compresa tra 25% e 90%			607-002-01-3	C	34	2-23-26	B
8	Acido acetico conc. sup. a 90%		64-19-7	607-002-00-6	C	10-35	2-23-26	B
9	Acido acrilico		79-10-7	607-061-00-8	C	10-34	26-36	D
10	Acido adipico		124-04-9	607-144-00-9	Xi	36		
11	Acido 3-amino-benzensolfonico		121-47-1	612-013-00-4	Xn	20/21/22	25-28	
12	Acido 4-amino-benzensolfonico		121-57-3	612-014-00-X	Xn	20/21/22	25-28	
13	Acido bromidrico anidro		10035-10-6	035-002-00-0	C	35-37	7/9-26-44	
14	Acido bromidrico conc. sup. a 40%			035-002-01-8	C	34-37	7/9-26	B
15	Acido bromoacetico			607-065-00-X	T	23/24/25-35	36/37/39	
16	Acido butirrico		107-92-6	607-135-00-X	C	34	26-36	
17	Acido cianidrico		74-90-8	006-006-00-X	F-T	12-26/27/28	7/9-13-16-45	
18	Acido cianidrico sali, ad esclusione dei cianuri complessi come ferrocianuri e ferricianuri e ossicianuro di Hg			006-007-00-5	T	26/27/28-32	1/2-7-28-29-45	A
19	Acido cloridrico anidro		7647-01-0	017-002-00-2	C	35-37	7/9-26-44	
20	Acido cloridrico conc.compresa tra 10% e 25%			017-002-02-7	Xi	36/38	2-28	B
21	Acido cloridrico conc. sup. a 25%			017-002-01-X	C	34-37	2-26	B
	Acido 4-cloro-fenossiacetico	n. 315						
	Acido (4-cloro-2-metil-fenossi)-acetico	n. 659						
	Acido 4-(4-cloro-2-metil-fenossi)-butirrico	n. 661						
	Acido 2-(4-cloro-2-metil-fenossi)-propionico	n. 664						
22	Acido 2-cloropropionico		598-78-7	607-139-00-1	C	22-35	23-26-28-36	
	Acido clorosolfonico	n. 289						
23	Acido dicloroacetico		79-43-6	607-066-00-5	C	35	26	
	Acido (2,4-dicloro-fenossi)-acetico	n. 331						
	Acido 4-(2,4-diclorofenossi)-butirrico	n. 334						
	Acido 2-(2,4-diclorofenossi)-propionico	n. 397						
24	Acido dicloroisocianurico		2782-57-2	613-029-00-4	O-Xn	8-22-31-36/37	8-26-41	
25	Acido dicloroisocianurico sali di sodio e di potassio			613-030-00-X	O-Xn	8-22-31-36/37	8-26-41	
	Acido (3,6-dicloro-2-metossi)-benzoico	n. 365						
26	Acido fluoborico conc. sup. a 25%		16872-11-0	009-010-00-X	C	34	26-27	B
27	Acido fluoridrico....%		7664-39-3	009-003-00-1	T-C	26/27/28-35	7/9-26-36/37-45	B
28	Acido fluoridrico anidro		32057-09-3	009-002-00-6	T-C	26/27/28-35	7/9-26-36/37-45	
29	Acido fluorosolfonico		7789-21-1	016-018-00-7	C	20-35	26	
30	Acido fluosilicico conc. sup. a 25%		16961-83-4	009-011-00-5	C	34	26-27	B
31	Acido formico conc.compresa tra 25% e 90%		64-18-6	607-001-01-8	C	34	2-23-26	B
32	Acido formico conc. sup. a 90%		64-18-6	607-001-00-0	C	35	2-23-26	B
33	Acido fosforico conc.compresa tra 10% e 25%			015-011-01-3	Xi	36	25	B
34	Acido fosforico conc. sup. a 25%		7664-38-2	015-011-00-6	C	34	26	B
35	Acido fumarico		110-17-8	607-146-00-X	Xi	36	26	

Numero d'ordine	SOSTANZA	Rif. sost.	CAS n.	N. CEE	CLASSIFICAZIONE ED ETICHETTATURA Simb.	R	S	Note
36	Acido iodidrico anidro		10034-85-2	053-002-00-9	C	35-37	7/9-26-44	
37	Acido iodidrico conc. sup. a 25%			053-002-01-6	C	34	26	B
38	Acido iodoacetico		64-69-7	607-068-00-6	T	26/27/28-35	22-36/37/39-45	
39	Acido isobutirrico		79-31-2	607-063-00-9	Xn	21/22		
40	Acido maleico		110-16-7	607-095-00-3	Xi	22-36/37/38	26-28-37	
41	Acido metacrilico		79-41-4	607-088-00-5	C	34	15-26	D
	Acido metañilico	n. 11						
42	Acido metansolfonico		75-75-2	607-145-00-4	C	34	26-36	
	Acido 2-metilpropenoico	n. 41						
43	Acido monocloroacetico		79-11-8	607-003-00-1	T	23/24/25-35	22-36/37/39	
44	Acido monofluoroacetico		144-49-0	607-081-00-7	T	28	1/2-20-22-26-45	
45	Acido 1-naftilacetico		86-87-3	607-087-00-X	Xn	22	24/25	
46	Acido nitrico conc.compresa tra 20% e 70%			007-004-01-9	C	35	2-23-26-27	B
47	Acido nitrico conc. sup. a 70%		7697-37-2	007-004-00-1	O-C	8-35	23-26-36	B
48	Acido ossalico		144-62-7	607-006-00-8	Xn	21/22	2-24/25	
49	Acido ossalico sali			607-007-00-3	Xn	21/22	2-24/25	A
50	Acido peracetico conc. sup. a 10%		79-21-0	607-094-00-8	O-C	5-22-34	3-27-36	B,D
51	Acido perclorico conc.compresa tra 10% e 50%			017-006-01-1	C	34	23-28-36	B
52	Acido perclorico conc. sup. a 50%		7601-90-3	017-006-00-4	O-C	5-8-35	23-26-36	B
	Acido picrammico	n. 100						
	Acido picrico	n. 999						
	Acido picrico sali	n. 811						
53	Acido propionico conc.compresa tra 10% e 25%		79-09-4	607-089-01-8	Xi	36/37/38	2	B
54	Acido propionico conc. sup. a 25%		79-09-4	607-089-00-0	C	34	2-23-26	B
55	Acido solfammico		5329-14-6	016-026-00-0	Xi	36/38	2-26-28	
	Acido solfanilico	n. 12						
	Acido solfidrico	n. 620						
56	Acido solfocianico		463-56-9	615-003-00-8	Xn	20/21/22-32	2-13	
57	Acido solfocianico sali			615-004-00-3	Xn	20/21/22-32	2-13	A
58	Acido solforico conc.compresa tra 5% e 15%			016-020-01-5	Xi	36/38	2-26	B
59	Acido solforico conc. sup a 15%		7664-93-9	016-020-00-8	C	35	2-26-30	B
	Acido stifnico	n.1000						
	Acido tiocianico	n. 56						
60	Acido tioglicolico		68-11-1	607-090-00-6	T	23/24/25-34	2-25-27-28	
61	Acido p-toluensolfonico (contenente non piu del 5% di H2SO4)		104-15-4	016-030-00-2	Xi	36/37/38	26-37	
62	Acido p-toluensolfonico (contenente piu del 5% di H2SO4)		104-15-4	016-029-00-7	C	34	26-37/39	
63	Acido tricloroacetico		76-03-9	607-004-00-7	C	35	24/25-26	
	Acido (2,3,6-triclorofenil)-acetico	n. 260						
	Acido 2,4,5-tricloro-fenossi-acetico	n. 922						
	Acido 2-(2,4,5-tricloro-fenossi)-propionico	n. 581						
	Acido tricloroisocianurico	n. 975						
64	Acido trifluoroacetico conc.compresa tra 2% e 10%		76-05-1	607-091-01-9	Xi	36/37/38	23-26	B
65	Acido trifluoroacetico conc. sup a 10%		76-05-1	607-091-00-1	C	20-35	9-26-27-28	B
66	Acido valerianico		109-52-4	607-143-00-3	C	34	26-36	
67	Aconitina		302-27-2	614-008-00-2	T	26/28	1-24-45	
68	Aconitina sali			614-009-00-8	T	26/28	1-24-45	A

Numero d ordine	S O S T A N Z A	Rif. sost.	CAS n.	N. CEE	CLASSIFICAZIONE ED ETICHETTATURA			
					Simb.	R	S	Note
	Acqua ossigenata conc.compresa tra 20% e 60%	n. 618						
	Acqua ossigenata conc. sup a 60%	n. 619						
69	Acrilamide		79-06-1	616-003-00-0	T	23/24/25-33	27-44	
70	Acrilati esclusi quelli espressamente indicati in questo allegato			607-133-00-9	Xi	36/37/38	26-28	
71	Acrilonitrile		107-13-1	608-003-00-4	F-T	45-11-23/24/25-38	53-16-27-44	D-E
	Acroleina	n. 856						
	Alcool allilico	n. 857						
72	Alcool amilico eccetto alcool amilico terziario		30899-19-5	603-006-00-7	Xn	10-20	24/25	C
	Alcool amilico terziario	n. 691						
73	Alcool benzilico		100-51-6	603-057-00-5	Xn	20/22	26	
	Alcool terz-butilico	n. 723						
	Alcool butilico, eccetto alcool terz-butilico	n. 209						
	Alcool etilico	n. 533						
74	Alcool furfurilico		98-00-0	603-018-00-2	Xn	20/21/22		
	Alcool isopropilico e alcool propilico	n. 854						
	Alcool metilamilico	n. 717						
	Alcool metilico	n. 683						
	Alcool propargilico	n. 865						
	Alcool propilico e alcool isopropilico	n. 854						
	Alcool tetraidrofurfurilico	n. 936						
	Aldeide acrilica	n. 856						
	Aldeide benzoica	n. 163						
75	Aldeide butirrica		123-72-8	605-006-00-2	F	11	9-29-33	
	Aldeide formica conc. sup. o uguale a 25%	n. 593						
	Aldeide formica conc. sup. o uguale a 1% e inferiore a 5%	n. 594						
	Aldeide formica conc. sup. o uguale a 5% e inferiore a 25%	n. 595						
76	Aldeide 2-furilica		98-01-1	605-010-00-4	T	23/25	24/25-44	
	Aldeide propionica	n. 850						
77	Aldicarb		116-06-3	006-017-00-X	T	26/27/28	1-13-28-45	
78	Aldrin		309-00-2	602-048-00-3	T	24/25-40-48	22-36/37-44	
79	Alletrina		584-79-2	006-025-00-3	Xn	20/21/22	2-13	
80	Allidochlor		93-71-0	616-004-00-6	Xn	20/21/22-36/38	2-13	
81	Allilamina		107-11-9	612-046-00-4	F-T	11-23/24/25	9-16-24/25-44	
	Allile cloruro	n. 309						
	Allile ioduro	n. 630						
	Allil-glicidil-etere	n. 82						
	3-Allil-2-metil-4-osso-ciclopent-2-en-1-ile (+/-)-2,2-dimetil-(2-metil-propen-1-il)-3-ciclopropancarbossilato	n. 79						
82	1-Allilossi-2,3-epossipropano		106-92-3	603-038-00-1	Xn	20-43	24/25	
83	Alluminio - alchili			013-004-00-2	F-C	14-17-34	16-43	
84	Alluminio cloruro anidro			013-003-00-7	C	34	7/8-28	
85	Alluminio fosfuro		20859-73-8	015-004-00-8	F-T	15/29-28	1/2-22-43-45	
86	Alluminio isopropilato			603-042-00-3	F	11	8-16	
87	Alluminio polvere (piroforica)		7429-90-5	013-001-00-0	F	15-17	7/8-43	
88	Alluminio polvere (stabilizzata)			013-002-00-1		10-15	7/8-43	
89	Ametrin		834-12-8	613-010-00-0	Xn	20/22	2-13	

Numero d'ordine	SOSTANZA	Rif. sost.	CAS n.	N. CEE	CLASSIFICAZIONE ED ETICHETTATURA			
					Simb.	R	S	Note
90	Amidithion		919-76-6	015-080-00-2	Xn	20/21/22	2-13	
91	Amile acetato		628-63-7	607-130-00-2		10	23	C
	Amile cloruro	n. 742						
92	Amile formiato		638-49-3	607-018-00-3		10		C
93	Amile propionato		624-54-4	607-131-00-8		10	23	C
94	2-Aminobenzidina			612-045-00-9	Xn	20/21/22	22-36	
95	4-Aminobifenile		92-67-1	612-072-00-6	T	45-22	53-44	E
96	4-Aminobifenile sali			612-073-00-1	T	45-22	53-44	A E
97	2-Aminobutano			612-052-00-7	F-Xi	11-36/37/38	13-16-29	
98	Aminocarb		2032-59-9	006-018-00-5	T	23/24/25	2-13-44	
99	4-Amino-N,N-dietilanilina		93-05-0	612-080-00-X	T	25-34	26-36-44	
100	2-Amino-4,6-dinitrofenolo		96-91-3	612-034-00-9	E-Xn	1-20/21/22	35	
101	2-Aminoetanolo		141-43-5	603-030-00-8	Xi	20-36/37/38		
102	2-Aminoetildimetilamina		108-00-9	612-075-00-2	F C	11-21/22-35	16-23-26-28-36	
	5-Amino-3-fenil-1-bis(dimetilamino)-fosforil-1H-1,2,4,triazolo	n. 559						
103	Aminofenolo			612-033-00-3	Xn	20/21/22	28	C
104	2-Amino-2-metilpropanolo		124-68-5	603-070-00-6	Xi	36/38		
105	3-Aminometil-3,5,5-trimetilecicloesil amina		2855-13-2	612-067-00-9	C	21/22-34-43	26-36/37/39	
106	2-Amino-propano		75-31-0	612-007-00-1	F-Xi	12-36/37/38	16-26-29	
107	1-Aminopropan-2-olo		78-96-6	603-082-00-1	C	34	23-26-36	
	3-Amino-1,2,4-1H-triazolo	n. 108						
(*) 108	Amitrolo		61-82-5	613-011-00-6	Xn	22-40-46	36-37	
109	Ammoniaca anidra		7664-41-7	007-001-00-5	T	10-23	7/9-16-38	
110	Ammoniaca soluzione conc.compresa tra 10 % e 35%			007-001-02-X	Xi	36/37/38	2-26	B
111	Ammoniaca soluzione conc. sup. a 35%			007-001-01-2	C	34-36/37/38	7-26	B
112	Ammonio bicromato		7789-09-5	024-003-00-1	E-Xi	1-8-36/37/38-43	28-35	
113	Ammonio bifluoruro			009-009-00-4	C	25-34	22-26-37	
114	Ammonio cloruro		12125-02-9	017-014-00-8	Xn	22-36	22	
115	Ammonio fluoruro		12125-01-8	009-006-00-8	T	23/24/25	1/2-26-44	
	Ammonio idrossido conc.compresa tra 10% e 35%	n. 110						
	Ammonio idrossido conc. sup. a 35%	n. 111						
(**) 116	Ammonio perclorato		7790-98-9	017-009-00-0	O	9-44	14-16-27-36/37	
117	Ammonio polisolfuri			016-008-00-2	C	31-34	26	
118	Anidride acetica		108-24-7	607-008-00-9	C	10-34	26	
119	Anidride 1,2,4-benzentricarbossilica		552-30-7	607-097-00-4	Xi	36/37/38-42	22-28	
120	Anidride 1,2-cicloesandicarbossilica		85-42-7	607-102-00-X	Xi	36/37/38	23-39	
	Anidride 4-cicloesen-1,2-dicarbossilica	n. 130						
	Anidride clorendica	n. 122						
	Anidride cromica	n. 321						
121	Anidride endo-cis-biciclo(2,2,1)-5-epten-2,3-dicarbossilica		129-64-6	607-105-00-6	Xi	36/37/38	39	
122	Anidride 1,4,5,6,7,7-esaclorobiciclo(2,2,1)-5-epten-2,3-dicarbossilica		115-27-5	607-101-00-4	Xi	36/37/38	25	
	Anidride esaidroftalica	n. 120						
123	Anidride fosforica		1314-56-3	015-010-00-0	C	35	22-26	
124	Anidride ftalica		85-44-9	607-009-00-4	Xi	36/37/38		
125	Anidride maleica		108-31-6	607-096-00-9	Xi	22-36/37/38-42	22-28-39	
126	Anidride 1-metil-5-norbornen-2,3-dicarbossilica		25134-21-8	607-106-00-1	Xn	22-36/37/38-42	39	C
127	Anidride propionica		123-62-6	607-010-00-X	C	34	26	
128	Anidride solforosa		7446-09-5	016-011-00-9	T	23-36/37	7/9-44	

Numero d'ordine	SOSTANZA	Rif. sost.	CAS n.	N. CEE	CLASSIFICAZIONE ED ETICHETTATURA Simb.	R	S	Note
129	Anidride succinica		108-30-5	607-103-00-5	Xi	36/37	25	
130	Anidride tetraidroftalica		85-43-8	607-039-00-5	Xi	36/37	25	
	Anidride trimellitica	n. 119						
	Anidride vanadica	n.1008						
131	Anilina		62-53-3	612-008-00-7	T	23/24/25-33	28-36/37-44	
132	Anilina sali			612-009-00-2	T	23/24/25-33	28-36/37-44	A
	o-Anisidina e p-anisidina	n. 731						
133	Antimonio composti esclusi triossido(Sb2 03),tetraossido(Sb204),pentaossido(Sb205),trisolfuro(Sb2S3),pentasolfuro(Sb2S5) e quelli espressamente indicati in questo allegato.			051-003-00-9	Xn	20/22	22	A
134	Antimonio pentacloruro		7647-18-9	051-002-00-3	C	34-37	26	
135	Antimonio tricloruro		10025-91-9	051-001-00-8	C	34-37	26	
136	Antimonio trifluoruro		7783-56-4	051-004-00-4	T	23/24/25	7-26-44	
(*) 137	Antu		86-88-4	006-008-00-0	T+	28-40	25-36/37-45	
138	Argento nitrato		7761-88-8	047-001-00-2	C	34	2-26	
139	Aria liquida			008-002-00-3	O	8-34	21	
140	Arsenico		7440-38-2	033-001-00-X	T	23/25	1/2-20/21-28-44	
141	Arsenico composti,esclusi quelli espressamente indicati in questo allegato			033-002-00-5	T	23/25	1/2-20/21-28-44	A
	Arsenico triossido	n. 356						
142	Atropina		51-55-8	614-010-00-3	T	26/28	1-25-45	
143	Atropina sali			614-011-00-9	T	26/28	1-25-45	A
(**) 144	Azaconazolo		60207-31-0	613-040-00-4	Xn	22-44	24	
145	4-Azaeptan-1,7-diamina		56-18-8	612-063-00-7	C	21/22-34-43	26-36/37/39	
146	3-Azapentan-1,5-diamina		111-40-0	612-058-00-X	C	21/22-34-43	26-36/37/39	
147	Azinphos-etile		2642-71-9	015-056-00-1	T	26/27/28	1-13-45	
148	Azinphos-metile		86-50-0	015-039-00-9	T	26/27/28-36/38	1-13-45	
	Aziridina	n. 555						
149	Azobenzene		103-33-3	611-001-00-6	Xn	20/22	28	
150	Azossibenzene		495-48-7	611-002-00-1	Xn	20/22	28	
151	Azotoato			015-082-00-3	Xn	20/22	2-13	
152	Azoto biossido		10102-44-0	007-002-00-0	T	26-37	7/9-26-45	
	Azoto tetrossido		10544-72-6					
153	Barban			006-020-00-6	Xn	20/21/22	2-13	
154	Bario clorato		13477-00-4	017-003-00-8	O-Xn	9-20/22	13-27	
155	Bario perclorato		13465-95-7	017-007-00-X	O-Xn	9-20/22	27	
156	Bario perossido		1304-29-6	056-001-00-1	O-Xn	8-20/22	13-27	
157	Bario polisolfuri			016-003-00-5	Xi	31-36/37/38	28	
158	Bario sali,escluso il solfato di bario e i sali espressamente indicati in questo allegato			056-002-00-7	Xn	20/22	28	A
159	Bario solfuro		21109-95-5	016-002-00-X	Xn	20/22-31	28	
160	Benquinox		495-73-8	650-006-00-8	T	23/24/25	2-13-44	
161	Bensulide		741-58-2	015-083-00-9	Xn	20/21/22	2-13	
162	Bentazon			613-012-00-1	Xn	20/21/22	2-13	
163	Benzaldeide		100-52-7	605-012-00-5	Xn	22	24	
	Benzale cloruro	n. 395						
164	Benzene		71-43-2	601-020-00-8	F-T	45-11-23/24/25-48	53-16-29-44	E
165	Benzidina		92-87-5	612-042-00-2	T	45-22	53-44	E
166	Benzidina sali			612-070-00-5	T	45-22	53-44	A E
167	Benzilamina			612-047-00-X	C	34	26	
168	Benzildimetilamina		103-83-3	612-074-00-7	C	10-20/21-22-34	26-36	

Numero d'ordine	SOSTANZA	Rif. sost.	CAS n.	N. CEE	CLASSIFICAZIONE ED ETICHETTATURA Simb.	R	S	Note
169	Benzile benzoato		120-51-4	607-085-00-9	Xn	22	25	
	Benzile bromuro	n. 201						
170	Benzile cloroformiato			607-064-00-4	C	34-37	26	
	Benzile cloruro	n. 310						
	Benzilidene cloruro	n. 395						
(**) 171	Benzo(a)antracene		56-55-3	601-033-00-9	T	45	53-44	
(**) 172	Benzo(a)pirene		50-32-8	601-032-00-3	T	45-46-47	53-44	
(**) 173	Benzo(b)fluorantene		205-99-2	601-034-00-4	T	45	53-44	
174	p-Benzochinone		106-51-4	606-013-00-3	T	23/25-36/37/38	26-28-44	
	p-Benzochinossima benzoilidrazone	n. 160						
	Benzo(d,e,f)crisene	n. 172						
	Benzo(e)acefenantrilene	n. 173						
	Benzoguanamina	n. 577						
175	Benzoile cloruro		98-88-4	607-012-00-0	C	34	26	
	Benzoile perossido	n. 359						
(**) 176	Benzo(j)fluorantene		205-82-3	601-035-00-X	T	45	53-44	
(**) 177	Benzo(k)fluorantene		207-08-9	601-036-00-5	T	45	53-44	
	Benzolo	n. 164						
178	Benzonitrile		100-47-0	608-012-00-3	Xn	21/22	23	
	N-(2-Benzotiazolil)-N'-metilurea	n. 179						
	Benzotricloruro	n. 976						
	Benzotrifluoruro	n. 988						
179	Benzthiazuron			006-036-00-3	Xn	20/21/22	2-13	
(**) 180	Benzyl violet 4B		1694-09-3	650-010-00-X	Xn	40	36/37	
181	Berillio		7440-41-7	004-001-00-7	T	26/27-37-39	26-28-45	
182	Berillio composti, esclusi silicati doppi di alluminio e berillio			004-002-00-2	T	26/27-37-39	26-28-45	A
	BGE	n. 230						
	BHC	n. 614						
183	Binapacril		485-31-4	609-024-00-1	T	23/24/25	2-13-44	
184	Bis-4-clorobenzoile perossido			617-011-00-7	E-Xi	3-36/37/38	3/7/9-14-27-34-37/39	
	0,0-Bis-(4-clorofenile) N-acetimidoil-fosforamidotioato	n. 809						
	1,1-Bis(4-clorofenil)-etanolo	n. 261						
	Bis(clorometil)etere	n. 788						
	(Bis-dimetil-carbamoil) disolfuro	n. 949						
	Bis(N,N-dimetil-ditiocarbammato)di zinco	n.1026						
	1,1'-Bis(3,5-dimetil-morfolinocarbonil-metil)-4,4'-bipiridilio	n. 750						
185	1,3-Bis(2,3-epossipropossi)-benzene		101-90-6	603-065-00-9	T	23/24/25-40-43	23-24-44	
186	1,4-Bis(2,3-epossipropossi)-butano			603-072-00-7	Xn	20/21-36/38-43	26-28-37/39	
187	2,2-Bis-(4-(2,3-epossipropossi)-fenil)-propano		1675-54-3	603-073-00-2	Xi	36/38-43	28-37/39	
	S-(1,2-Bis(etossi-carbonil)-etil)-0,0-dimetil-ditiofosfato	n. 655						
	Bisfenolo-A-epicloridrina, prodotto di reazione. Resine epossidiche (peso molecolare medio inferiore o uguale a 700)	n. 847						
188	Bis(1-idrossicicloesile) perossido			617-010-00-1	E-C	3-35	3/7/9-14-27-34 37/39	
189	2,5-Bis(idrossimetile)tetraidrofurano			603-062-00-2	Xi	36/37/38	39	
	Bis-(metossi-tiocarbonile) disolfuro	n. 458						
190	Bis(2,4,6-trinitrofenil)amina		131-73-7	612-018-00-1	E-T	2-26/27/28-33	35-36-44	

Numero d'ordine	SOSTANZA	Rif. sost.	CAS n.	N. CEE	CLASSIFICAZIONE ED ETICHETTATURA Simb.	R	S	Note
191	Bis(2,4,6-trinitrofenil)amina sale di ammonio		2844-92-0	612-019-00-7	E-T	1-26/27/28-33	35-36-45	
192	Boro tribromuro			005-003-00-0	T	14-26/28-35	9-26-28-36-45	
193	Boro tricloruro		10294-34-5	005-002-00-5	T	14-26/28-34	9-26-28-36-45	
194	Boro trifluoruro		7637-07-2	005-001-00-X	T	14-26-35	9-26-28-36-45	
195	Bromo		7726-95-6	035-001-00-5	C	26-35	7/9-26	
196	Bromobenzene		108-86-1	602-060-00-9	Xi	10-38		
197	Bromoetano		74-96-4	602-055-00-1	Xn	20/21/22	28	
198	Bromofenoxim		73-85-1	609-032-00-5	Xn	20/22	2-13	
	Bromoformio	n. 962						
199	Bromophos-etile		4824-78-6	015-064-00-5	T	23/24/25	2-13-44	
200	1-Bromopropano		106-94-5	602-019-00-5	F-T	11-23/27/28	7/9-29-45	
201	alfa-Bromotoluene			602-057-00-2	Xi	36/37/38	39	
202	Bromoxynil		1689-84-5	608-006-00-0	T	23/24/25	2-13-44	
203	Brucina		357-57-3	614-006-00-1	T	26/28	1-13-45	
204	Brucina sali			614-007-00-7	T	26/28	1-13-45	A
205	1,3-Butadiene		106-99-0	601-013-00-X	F	13	9-16-33	D
206	1,3-Butandiol-diacrilato			607-118-00-7	C	21-34-43	26-36/37/39	D
207	1.4-Butandiol-diacrilato			607-119-00-2	C	21-34-43	26-36/37/39	D.
	Butandiol-glicidiletere	n. 186						
208	Butano		106-97-8	601-004-00-0	F	13	9-16-33	C
209	Butanolo, eccetto alcool terz-butilico		71-36-3 78-92-2 78-83-1	603-004-00-6	Xn	10-20	16	C
(**) 210	Butanone		78-93-3	606-002-00-3	F-Xi	11-36/37	9-16-25-33	
211	2-Butanonossima		96-29-7	616-014-00-0	Xi	35-43	23-24	
212	2-Butenale		4170-30-3	605-009-00-9	F-T	11-23-36/37/38	29-33-44	
213	Butene		106-98-9 107-01-7 115-11-7	601-012-00-4	F	13	9-16-33	C
214	n-Butilamina		109-73-9	612-005-00-0	F-Xi	11-36/37/38	16-26-29	
215	2-terz-Butilaminoetile metacrilato		3775-90-4	607-128-00-1	Xi	36/39-43	26	D
	O-(4-terz-Butil-2-cloro-fenil)-O-metil-fosforamide	n. 322						
216	terz-Butil-8-cumile perossido			617-007-00-5	O-Xi	11-36/37/38	3/7/9-14-27-37/39	
	terz-Butil-cumil-perossido	n. 216						
	2-sec-Butil-4,6-dinitrofenil-isopropil-carbonato	n. 468						
	2-terz-Butil-4,6-dinitrofenolo	n. 475						
217	n-Butile acetato		123-86-4	607-025-00-1		10		
218	sec-Butile acetato; terz-butile acetato; isobutile acetato		105-46-4 540-88-5	607-026-00-7	F	11	16-23-29-33	C
219	n-Butile acrilato		141-32-2	607-062-00-3	Xi	10-36/37/38-43	9	D
220	Butile butirrato		109-21-7	607-031-00-4		10		C
221	Butile cloroformiato		592-34-7	607-138-00-6	T	10-23-34	26-36-44	
222	Butile formiato		592-84-7 589-40-2 762-75-4	607-017-00-8	F	11	9-16-33	C
223	n-Butile metacrilato		97-88-1	607-033-00-5	Xi	10-36/37/38-43		D
	Butilene	n. 213						
224	terz-Butile perossido			617-001-00-2	O-Xi	11-37/38	3/7/9-14-27-37/39	
	Butiletilchetone	n. 514						
	n-Butil-glicidil-etere	n. 230						

Numero d'ordine	SOSTANZA	Rif. sost.	CAS n.	N. CEE	CLASSIFICAZIONE ED ETICHETTATURA Simb.	R	S	Note
	Butilglicol	n. 231						
	Butilglicol acetato	n. 232						
225	Butilpropionato			607-029-00-3		10		C
	2-Butin-1,4-diolo	n. 226						
226	But-2-in-1,4-diolo		110-65-6	603-076-00-9	T	25-34	22-36-44	
	Butirraldeide	n. 75						
227	Butirraldeideossima		110-69-0	616-013-00-5	T	22-24-36	23-36-44	
228	Butirrile cloruro		141-75-3	607-136-00-5	F-C	11-34	16-23-26-36	
229	n-Butirronitrile		109-74-0	608-005-00-5	T	10-23/24/25	44	
230	1-Butossi-2,3-epossipropano		2426-08-6	603-039-00-7	Xn	20-43	24/25	
231	2-Butossietanolo		111-76-2	603-014-00-0	Xn	20/21/22-37	24/25	
232	2-Butossietil acetato		112-07-2	607-038-00-2	Xn	20/21	24	
233	3-Butossi-2-propanolo			603-052-00-8	Xi	36/38		
234	1-(2-Butossipropossi)-2-propanolo			603-050-00-7	Xn	21/22		
235	Cadmio cianuro		542-83-6	048-004-00-1	T	26/27/28-32-33-40	1/2-7-28-29-45	
236	Cadmio cloruro		10108-64-2	048-008-00-3	T	45-23/25-48	53-44	E
237	Cadmio composti, esclusi il solfuro(CdS), il solfoseleniuro(xCdS . yCdSe), i solfuri misti di cadmio e zinco(xCdS . yZnS), i solfuri misti di cadmio e mercurio(xCdS . yHgS) e quelli espressamente indicati in questo allegato.			048-001-00-5	Xn	20/21/22	22	A
238	Cadmio esafluosilicato			048-005-00-7	T	23/25-33-40	22-44	
239	Cadmio fluoruro		7790-79-6	048-006-00-2	T	23/25-33-40	22-44	
240	Cadmio formiato		4464-23-7	048-003-00-6	T	23/25-33-40	22-44	
241	Cadmio ioduro		7790-80-9	048-007-00-8	T	23/25-33-40	22-44	
242	Cadmio ossido		1306-19-0	048-002-00-0	T	23/25-33-40	22-44	
243	Calcio		7440-70-2	020-001-00-X	F	15	8-24/25-43	
244	Calcio carburo		75-20-7	006-004-00-9	F	15	8-43	
245	Calcio cloruro		10043-52-4 22691-02-7	017-013-00-2	Xi	36	22-24	
246	Calcio cromato		13765-19-0	024-008-00-9	T	45-22	53-44	E
247	Calcio fosfuro		1305-99-3	015-003-00-2	F-T	15/29-28	1/2-22-43-45	
248	Calcio idruro		7789-78-8	001-004-00-5	F	15	7/8-24/25-43	
249	Calcio ipoclorito conc. Cl attivo sup. a 39%		7778-54-3	017-012-00-7	O-C	8-31-34	2-26-43	
250	Calcio polisolfuri			016-005-00-6	Xi	31-36/37/38	28	
251	Calcio solfuro		20548-54-3	016-004-00-0	Xi	31-36/37/38	28	
	Calomelano	n. 672						
(**) 252	Canfecloro		8001-35-2	602-044-00-1	T	21-25-37/38-40	36/37-44	
	Canfene clorurato	n. 252						
253	Carbaril		63-25-2	006-011-00-7	Xn	20/22-37	2-13	
254	Carbofenothion		786-19-6	015-044-00-6	T	23/24/25	2-13-44	
255	Carbofuran		1563-77-2	006-026-00-9	T	26/28	1-13-45	
256	Carbonile cloruro		75-44-5	006-002-00-8	T	26	7/9-24/25-45	
257	Carbonio ossido		630-08-0	006-001-00-2	F-T	12-23	7-16	
258	Carbonio solfuro		75-15-0	006-003-00-3	F-T	12-26	27-29-33-43-45	
	Carbonio tetracloruro	n. 933						
	Chinone	n. 174						
(*) 259	Chlordecone		143-50-0	606-019-00-6	T	24/25-40	22-36/37-44	
260	Chlorfenac		85-34-7	607-074-00-9	Xn	20/21/22	2-13	
261	Chlorfenetol			603-049-00-1	Xn	20/21/22	2-13	
262	Chlorfenprop-metile			607-075-00-4	Xn	20/22	2-13	
263	Chlorfonium		115-78-6	015-085-00-X	T	23/24/25	2-13-44	A

Numero d'ordine	SOSTANZA	Rif. sost.	CAS n.	N. CEE	CLASSIFICAZIONE ED ETICHETTATURA			Note
					Simb.	R	S	
264	Chlortion		500-28-7	015-042-00-5	Xn	20/21/22	2-13	
265	Cianamide		420-04-2	615-013-00-2	T	25-36/38-43	3-22-36-44	
	O-(4-Cianofenil)-O,O-dimetil-tiofosfato	n. 330						
266	Cianogeno		460-19-5	608-011-00-8	F-T	11-23	23-44	
267	2-Cian-propan-2-olo		75-86-5	608-004-00-X	T	26/27/28	7/9-27-45	
268	Ciantoato			015-070-00-8	T	26/27/28	1-13-45	
	Cianurile cloruro	n. 977						
269	Ciclobutan-1,3-dione		15506-53-3	606-008-00-6	F	11	9-16-33	
270	Cicloesano		110-82-7	601-017-00-1	F	11	9-16-33	
271	Cicloesanolo		108-93-0	603-009-00-3	Xn	20/22-37/38	24/25	
272	Cicloesanone		108-94-1	606-010-00-7	Xn	10-20	25	
273	Cicloesilamina		108-91-8	612-050-00-6	C	10-21/22-34	36/97/38	
	2-Cicloesil-4,6-dinitrofenolo							
274	Cicloesile acrilato		3066-71-5	607-116-00-6	Xi	37/38		D
	3-Cicloottil-1,1-dimetilurea	n. 278						
275	Ciclopentano		287-92-3	601-030-00-2	F	11	9-16-29-33	
276	Ciclopentanone		120-92-3	606-025-00-9	Xi	10-36/38	23	
277	Ciclopropano		75-19-4	601-016-00-6	F	13	9-16-33	
278	Cicluron		2163-69-1	006-027-00-4	Xn	20/21/22	2-13	
279	Ciexatin			050-002-00-0	Xn	20/21/22	2-13	
280	Cinerina I		97-12-1	613-025-00-2	Xn	20/21/22	2-13	
281	Cinerina II		121-20-0	613-026-00-8	Xn	20/21/22	2-13	
282	Cloralio idrato			605-014-00-6	T	25-36/38	25-44	
283	Cloralose		14798-36-8	605-013-00-0	Xn	20/22	2-16-24/25-28	
284	Cloramina T (sale sodico)			616-010-00-9	Xi	36/37/38	2-7-15	
(*) 285	Clordano		57-74-9	602-047-00-8	Xn	21/22-40	36/37	
(*) 286	Clordimeform		6164-98-3	650-007-00-3	Xn	21/22-40	22-36/37	
(*) 287	Clordimeform, cloridrato		19750-95-9	650-009-00-4	Xn	22-40	22-36/37	
	Clorfenamidina	n. 286						
288	Clorfenvinfos		470-90-6	015-071-00-3	T	26/27/28	1-13-28-45	
	Cloridrina etilenica	n. 299						
289	Cloridrina solforica		7790-94-5	016-017-00-1	C	14-35-37	26	
290	Cloro		7782-50-5	017-001-00-7	T	23-36/37/38	7/9-44	
291	Cloroacetilcloruro		79-04-9	607-080-00-1	C	34-37	9-26	
292	Cloroacetonitrile			608-008-00-1	T	23/24/25	44	
	2-Cloroallile dietilditiocarbammato	n. 920						
293	Cloroanilina mono-		27134-26-5	612-010-00-8	T	23/24/25-33	28-36/37-44	C
	di-		27134-27-6					
	tri-		18487-39-3					
294	2-Clorobenzaldeide		89-98-5	605-011-00-X	C	34	26	
	o-Clorobenzaldeide	n. 294						
	Clorobenzolo	n. 740						
295	2-Clorobenzonitrile		873-32-5	608-013-00-9	Xn	21/22-36	23	
296	2-Cloro-1,3-butadiene		31900-55-7	602-036-00-8	F-Xn	12-20	9-16-29-33	D
297	1-Clorobutano			602-059-00-3	F	11	9-16-29	
	(4-Cloro-but-2-inil)-N-(3-cloro-fenil)-carbammato	n. 153						
	p-Cloro-m-cresolo	n. 303						
	O-(2-Cloro-1-(2,4-dicloro-fenil)-vinil)-O,O-dietilfosfato	n. 288						
	(2-Cloro-3-dietilamino-1-metil-3-osso-prop-1-enil)-dimetil-fosfato	n. 593						
	2-Cloro-4-dimetilamino-6-metil-pirimidina	n. 317						

Numero d'ordine	S O S T A N Z A	Rif. sost.	CAS n.	N. CEE	CLASSIFICAZIONE ED ETICHETTATURA Simb.	R	S	Note
298	1-Cloro-2,3-epossipropano		106-89-8	603-026-00-6	T	45-10-23/24/25-34-43	53-9-44	E
299	2-Cloroetanolo		107-07-3	603-028-00-7	T	26/27/28	7/9-28-45	
	2-(4-Cloro-6-etilamino-1,3,5-triazin-2-il)amino-2-metil-propionitrile	n. 329						
	Cloroetilene	n.1011						
	(2-Cloroetil)-trimetilammonio	n. 301						
	0-(4-(4-Clorofenilazo)-fenil)-0,0-dimetil-tiofosfato	n. 151						
	(4-Clorofenil)-benzensolfonato	n. 583						
	3-(4-Clorofenil)-1,1-dimetilurea	n. 749						
	2-(2-(4-Cloro-fenil-2-fenil)-acetil)-indan-1,3-dione	n. 311						
	4-(2-Cloro-fenilidrazone)-3-metil-4H-5-isossazolone	n. 495						
	N'-(4-Clorofenil)-N-metossi-N-metilurea	n. 748						
	3-(1-(4-Cloro-fenil)-3-osso-butil)-4-idrossi-cumarina	n. 323						
300	Clorofenolo			604-008-00-0	Xn	20/21/22	2-28	C
	Cloroformio	n. 970						
	S-((2-Cloro-1-ftalimido)etil)-0,0-dietil-ditiofosfato	n. 348						
301	Cloromequat		999-81-5	007-003-00-6	Xn	20/21/22	2-13	A
(**) 302	Clorometano		74-87-3	602-001-00-7	F-Xn	13-20-40-48	9-16-33	
303	4-Cloro-3-metilfenolo		59-50-7	604-014-00-3	Xn	21/22-38	26-28	
	Clorometil (metil) etere	n. 304						
304	Clorometil (metil) ossido		107-30-2	603-075-00-3	F-T	45-11-20/21/22	53-9-16-44	E
305	3-Cloro-2-metil-1-propene		513-47-3	602-032-00-6	F-Xn	11-20	9-16-29-33	
	N'-(3-Cloro-4-metossi-fenil)-N,N-dimetilurea	n. 737						
306	Cloronitroanilina			610-006-00-0	T	26/27/28-33	28-36/37-45	C
307	1-Cloro-4-nitrobenzene		100-00-5	610-005-00-5	T	23/24/25-33	28-37-44	
	p-Cloronitrobenzolo	n. 307						
	0-(3-Cloro-4-nitro-fenil)-0,0-dimetiltiofosfato	n. 264						
	0-(4-Cloro-3-nitro-fenil)-0,0-dimetiltiofosfato	n. 810						
308	1-Cloro-1-nitropropano		600-25-9	610-007-00-6	Xn	20/22		
	Cloropicrina	n. 972						
	Cloroprene	n. 296						
309	3-Cloropropene		107-05-1	602-029-00-X	F-T	11-26	16-29-33-45	D
310	alfa-Clorotoluene		100-44-7	602-037-00-3	Xi	36/37/38	39	
311	Clorphacinone			606-014-00-9	T	26/27/28	1-13-44	
312	Clorpirifos		2921-88-2	015-084-00-4	T	23/24/25	2-13-44	
313	Clortiamid		1918-13-4	616-005-00-1	Xn	20/21/22	2-13	
	Cloruro rameoso	n. 870						
314	Colchicina		64-86-8	614-005-00-6	T	26/28	1-13-45	
315	4-CPA		122-88-3	607-073-00-3	Xn	20/21/22	2-13	
	Cresile glicidile etere	n. 509						
316	Cresolo		1319-77-3	604-004-00-9	T	24/25-34	2-28-44	C
317	Crimidina		535-89-7	613-004-00-8	T	26/27/28	1-13-45	
(*) 318	Cromato di piombo		7758-97-6	082-004-00-2	Xn	33-40	22	
	Cromile cloruro	n. 320						
(**) 319	Cromo(III) cromato		24613-89-6	024-010-00-X	O-T	45-8-35-43	53-44	
320	Cromo ossicloruro		7791-14-2	024-005-00-2	O-C	8-35	7/8-22-28	

Numero d'ordine	SOSTANZA	Rif. sost.	CAS n.	N. CEE	CLASSIFICAZIONE ED ETICHETTATURA Simb.	R	S	Note
321	Cromo triossido		1333-82-0	024-001-00-0	O-C	8-35-43	28	
	Crotonaldeide	n. 212						
322	Crufomato		299-86-5	015-074-00-X	Xn	20/21/22	2-13	
323	Cumacloro		81-82-3	607-057-00-6	Xn	20/21/22	2-13-44	
324	Cumafuril			607-058-00-1	T	23/24/25	2-13-44	
325	Cumaphos		56-72-4	015-038-00-3	T	26/27/28	1-13-28-45	
326	Cumatetralil		5836-29-3	607-059-00-7	T	26/27/28	1-13-45	
	Cumene	n. 858						
327	Cumene idroperossido			617-002-00-8	O-C	11-35	3/7/9-14-27-37/39	
328	Cumitoato		572-48-5	015-086-00-5	T	23/24/25	2-13-44	
329	Cyanazine			613-013-00-7	T	23/24/25	2-13-44	
330	Cyanophos		2636-26-2	015-087-00-0	Xn	20/21/22	2-13	
331	2,4-D		94-75-7	607-039-00-8	Xn	20/21/22	2-13	
(**) 332	Dapsone		80-08-0	612-084-00-1	Xn	22	22	
333	Dazomet		533-74-4	613-008-00-X	Xn	21/22	2-13	
334	2,4-DB			607-083-00-8	Xn	20/21/22	2-13	
335	2,4-DB sali			607-084-00-3	Xn	20/21/22	2-13	A
(*) 336	DDT		50-29-3	602-045-00-7	T	25-40-48	22-36/37-44	
	Decacloropentaciclo (5.2.1.0(2,6).0(3,9).0(5,8))decan-4-one	n. 259						
337	Decarbofurano			006-022-00-7	T	23/24/25	2-13-44	
338	Demeton-O		8000-97-3	015-028-00-9	T	26/27/28-36	1-13-26-28-45	
339	Demeton-O-metile		867-27-6	015-030-00-X	T	23/24/25-36	2-13-26-44	
340	Demeton-S-metile		919-86-8	015-031-00-5	T	23/24/25-36	2-13-26-44	
341	Demeton-S-metilsolfone			015-078-00-1	T	23/24/25	2-13-44	
342	Demeton-S		126-75-0	015-029-00-4	T	26/27/28-36	1-13-26-28-45	
343	Desmetrin		1014-69-3	613-007-00-4	Xn	20/21/22	2-13	
344	2,4-D esteri e sali			607-040-00-3	Xn	20/21/22	2-13	A
345	N,N'-Diacetilbenzidina			612-044-00-3	Xn	20/21/22	22-36	
	Diacetonalcool	n. 625						
346	Diacetonalcool, tecnico		123-42-2	603-017-00-7	F-Xi	11-36	7-16-24/25	
347	Diacrilato di 2,2-dimetilpropan-1,3-propandiolo			607-112-00-4	T	24-36/38-43	28-39-44	D
348	Dialifos			015-088-00-6	T	26/27/28	1-13-45	
(*) 349	Diallate		2303-16-4	006-019-00-0	Xn	22-40	25-36/37	
	N,N-Diallilcloracetamide	n. 80						
350	Diallile ftalato		131-17-9	607-086-00-4	Xn	22	24/25	
	4,4'-Diaminobifenile	n. 165						
351	4,4'-Diaminodifenilmetano			612-051-00-1	Xn	20/21/22		
	4,4'-Diaminodifenilsulfone	n. 332						
352	1,2-Diaminoetano		107-15-3	612-006-00-6	C	10-21/22-34-43	9-26-36/37/39	
	S-((4,6-Diamino-1,3,5-triazin-2-il)-metil)-O,O-dimetil-ditiofosfato	n. 666						
353	Dianidride 1,2,4,5-benzentetracarbossilica		89-32-7	607-098-00-X	Xi	36/37/38	25	
354	Dianidride 3,3',4,4'-benzofenontetracarbossilica		2421-28-5	607-100-00-9	Xi	36/37	25	
355	Dianidride 1,2,3,4-ciclopentantetracarbossilica			607-104-00-0	Xi	36/37	25	
	Dianidride piromellitica	n. 353						
	o-Dianisidina	n. 455						
	o-Dianisidina sali	n. 456						
(*) 356	Diarsenico triossido		1327-53-3	033-003-00-0	T+	45-28-34	53-45	E
357	3,6-Diazaottan-1,8-diamina		112-24-3	612-059-00-5	C	21-34-43	26-36/37/39	

Numero d'ordine	S O S T A N Z A	Rif. sost.	CAS n.	N. CEE	CLASSIFICAZIONE ED ETICHETTATURA			
					Simb.	R	S	Note
358	Diazinone		333-41-5	015-040-00-4	T	23/24/25	2-13-44	
359	Dibenzoile perossido			617-008-00-0	E-Xi	3-36/37/38	3/7/9-14-27-34-37/39	
360	1,2-Dibromo-3-cloropropano		96-12-8	602-021-00-6	T	45-46-20/21-25-48	53-44	E
	O-(1,2-Dibromo-2,2-dicloro-etil)-0,0-dimetil-fosfato	n. 761						
361	1,2-Dibromoetano		106-93-4	602-010-00-6	T	45-23/24/25-36/37/38	53-44	E
	3,5-Dibromo-4-idrossi-benzonitrile	n. 202						
362	Dibromometano		74-95-3	602-003-00-8	Xn	20	24	
363	Di-n-butilamina (1), di-sec-butilamina		111-92-2	612-049-00-0	Xn	10-20/21/22		
364	Di-n-butil-etere		142-96-1	603-054-00-9	Xi	10-36/37/38		
365	Dicamba		1918-00-9	607-043-00-X	Xn	20/21/22	2-13	
366	Dicamba sali			607-044-00-5	Xn	20/21/22	2-13	A
367	Dichetene		674-82-8	606-017-00-5	Xn	10-20	3	D
368	Dichlone		117-80-6	606-018-00-0	Xn	20/21/22-38	2-13	
369	Dicicloesilamina		101-83-7	612-066-00-3	C	22-34	36/37/39	
370	Dicicloesilammonio nitrito		3129-91-7	007-009-00-9	Xn	20/22	15-41	
371	Dicicloesilmetan-4,4'-diisocianato		5124-30-1	615-009-00-0	T	23-36/37/38-42/43	26-28-38-45	
372	Diclofenthion		97-17-6	015-068-00-7	Xn	20/21/22	2-13	
373	Diclofluanide		1085-98-9	616-006-00-7	Xn	20/21/22	2-13	
374	Dicloroacetile cloruro		79-36-7	607-067-00-0	C	35	9-26	
	S-2,3-Dicloroallile diisopropiltiocarbammato	n. 349						
375	1,2-Diclorobenzene		95-50-1	602-034-00-7	Xn	20	24/25	
376	1,4-Diclorobenzene		106-46-7	602-035-00-2	Xn	22	2-24/25	
377	3,3'-Diclorobenzidina		91-94-1	612-068-00-4	T	45-21-43	53-44	E
378	3,3'-Diclorobenzidina sali			612-069-00-X	T	45-21-43	53-44	A E
	4-4'-Diclorobenzoile perossido	n. 184						
	o-Diclorobenzolo	n. 375						
	p-Diclorobenzolo	n. 376						
379	1,1-Dicloroetano		75-34-3	602-011-00-1	F-Xn	12-20	7-16-29-33	
(**) 380	1,2-Dicloroetano		107-06-2	602-012-00-7	F-T	45-11-22-36/37/38	53-16-29-44	E
381	1,1-Dicloroetilene		75-35-4	602-025-00-8	F-Xn	12-20-40	7-16-29	D
382	1,2-Dicloroetilene		540-59-0	602-026-00-3	F-Xn	11-20	7-16-29	
383	2,2'-Dicloroetiletere		111-44-4	603-029-00-2	T	10-26/27/28-40	7/9-27-38-45	
	N'-(3,4-Dicloro-fenil)-N,N-dimetil-urea	n. 490						
	1((2-(2,4-Diclorofenil)-1,3-diossolan-2-il)metil)-1H-1,2,4-triazolo	n. 144						
	(2,4-Diclorofenil)(fenil)(5-pirimidinil) metanolo	n. 960						
	3-(3,4-Dicloro-fenil)-1-metossi-1-metil-urea	n. 648						
	N-(3,4-Diclorofenil)-propionamide	n. 851						
384	2,4-Diclorofenolo		120-83-2	604-011-00-7	Xn	22-36/38	26-28	
	2-(2,4-Diclorofenossi)-etile solfato acido	n. 487						
	N'-(Diclorofluorometil)tio-N,N-dimetil-N'-fenil-sulfonildiamide	n. 373						
385	N-(Diclorofluorometiltio)-ftalimide			616-012-00-X	Xi	38	28	
386	Dicloroisocianurato sodico biidrato			613-030-01-7	Xn	22-31-36/37	8-26-41	

Numero d'ordine	SOSTANZA	Rif. sost.	CAS n.	N. CEE	CLASSIFICAZIONE ED ETICHETTATURA Simb.	R	S	Note
387	Diclorometano		75-09-2	602-004-00-3	Xn	20	24	
388	2,2'-Dicloro-4,4'-metilendianilina		101-14-4	612-078-00-9	T	45-22	53-44	E
389	2,2'-Dicloro-4,4'-metilendianilina sali			612-079-00-4	T	45-22	53-44	A E
	2,3-Dicloro-1,4-naftochinone	n. 368						
390	1,1-Dicloro-1-nitroetano		594-72-9	610-002-00-9	T	23/24/25	26-44	
391	Dicloropropano			602-020-00-0	F-Xn	11-20	9-16-29-33	C
(**) 392	1,3-Dicloro-2-propanolo		96-23-1	602-064-00-0	T	45-21-25	53-44	E
393	1,1-Dicloropropene (1) 1,2-Dicloropropene (2)		563-58-6 563-54-2	602-031-00-0	F-T	11-25	16-29-33-44	C
394	1,3-Dicloropropene (1) 2,3-dicloropropene (2) 3,3-Dicloropropene (3)		542-75-6 78-88-6 563-57-5	602-030-00-5	F-Xn	11-22	9-16-29-33	C
	2,6-Dicloro-tiobenzamide	n. 313						
395	alfa,alfa-Diclorotoluene		98-87-3	602-058-00-8	Xi	36/37/38	39	
	(2,2-Dicloro-vinil)-dimetil-fosfato	n. 399						
396	O-(2,2-Dicloro-vinil)-O-metil-O-(2-etil-solfinil-etil)-fosfato		7076-53-1	015-077-00-6	T	23/24/25	2-13-44	
397	Diclorprop		120-36-5	607-045-00-0	Xn	20/21/22	2-13	
398	Diclorprop sali			607-046-00-6	Xn	20/21/22	2-13	A
399	Diclorvos		62-73-7	015-019-00-X	T	23/24/25	2-13-44	
400	Dicofol		115-32-2	603-044-00-4	Xn	20/21/22	2-13	
401	Dicrotophos			015-073-00-4	T	26/27/28	1-13-28-45	
402	Dicumarina		66-76-2	607-060-00-2	T	23/24/25	2-13-44	
403	α,α'-Dicumile perossido			617-006-00-X	O-Xi	11-36/37/38	3/7/9-14-27-37/39	
	Dicumile perossido	n. 403						
(*) 404	Dieldrin		60-57-1	602-049-00-9	T+	25-27-40-48	22-36/37-45	
405	1,2:3,4-Diepossi-butano		1464-53-5	603-060-00-1	T	23/24/25-36/37/38-40-42/43	23-24-44	
406	Dietanolamina		111-42-2	603-071-00-1	Xi	36/38	26	
407	Dietilamina		109-89-7	612-003-00-X	F-Xi	11-36/37	16-26-29	
408	2-Dietilaminoetanolo		100-37-8	603-048-00-6	Xi	36/37/38	28	
409	2-Dietilaminoetile metacrilato			607-127-00-6	Xn	20-36/38-43	26	D
	3-(Dietilamino)-propilamina	n. 411						
410	N,N-Dietilanilina		91-66-7	612-054-00-8	T	23/24/25-33	28-37-44	
	O,O-Dietil-O-(4-bromo-2,5-dicloro-fenil)-tiofosfato	n. 199						
	Dietilchetone	n. 808						
	O,O-Dietil-S-((2-cian-2-metil-etil)-carbamoil)-metil-tiofosfato	n. 268						
	N,N-Dietil-S-2-cloro-allil-ditiocarbammato	n. 920						
	O,O-Dietil-S-((4-cloro-fenil-tio)-metil)-ditiofosfato	n. 254						
	O,O-Dietil-O-(3-cloro-4-metilcumarin-7-il)-monotiofosfato	n. 325						
	O,O-Dietil-S-((6-cloro-2-osso-1,3-benzossazolin-3-il)-metil)-ditiofosfato	n. 598						
411	N,N-Dietil-1,3-diaminopropano			612-062-00-1	C	10-21/22-34-43	26-36/37/39	
	O,O-Dietil-O-(2,4-dicloro-fenil)-tiofosfato	n. 372						
	O,O-Dietil-S-((2,5-dicloro-fenil-tio)-metil)-ditiofosfato	n. 579						
	O,O-Dietil-O-(2-dietilamino-6-metil-pirimidin-4-il)-tiofosfato	n. 829						

Numero d'ordine	SOSTANZA	Rif. sost.	CAS n.	N. CEE	CLASSIFICAZIONE ED ETICHETTATURA Simb.	R	S	Note
	Dietilenetriamina	n. 146						
412	Dietilenglicol diacrilato			607-120-00-8	T	24-36/38-43	28-39-44	D
	Dietilenglicol dinitrato	n. 464						
413	Dietile ossalato		95-92-1	607-147-00-5	Xn	22-36	23	
	0,0-Dietil-S-(2-etilsulfinil-etil)-ditiofosfato	n. 792						
	0,0-Dietil-S-(2-etiltio-etil)-ditiofosfato	n. 488						
	0,0-Dietil-0-(2-etiltio-etil)-tiofosfato	n. 356						
	0,0-Dietil-S-(2-etiltio-etil)-tiofosfato	n. 342						
	0,0-Dietil-S-(etiltio-metil)-ditiofosfato	n. 592						
	0,0-Dietil-S-(N-etossi-carbonil-N-metil-carbamoil-metil)-ditiofosfato	n. 663						
	N,N-Dietil-p-fenilendiamina	n. 99						
	0,0-Dietil-S-(N-isopropil-carbamoil-metil)-ditiofosfato	n. 868						
	0,0-Dietil-0-(2-isopropil-4-metil-pirimidin-6-il)-tiofosfato	n. 358						
414	0,0-Dietil-0-(4-metilcumarin-7-il)-tiofosfato		299-45-6	015-076-00-0	T	26/27/28	1-13-28-45	
	0,0-Dietil-N-(4-metil-1,3-ditiolan-2-iliden)-fosforoamidato	n. 669						
	0,0-Dietil-0-(3-metil-1H-pirazol-5-il)-fosfato	n. 823						
	0,0-Dietil-0-(4-metilsulfinil-fenil)-tiofosfato	n. 584						
	0,0-Dietil-0-(4-nitro-fenil)-tiofosfato	n. 797						
	0,0-Dietil-S-((4-osso-3H-1,2,3-benzotriazin-3-il)metil)-ditiofosfato	n. 147						
	0,0-Dietil-(6-osso-7,8,9,10-tetraidro-benzo(c)cromen-3-il)-tiofosfato	n. 326						
415	Dietilsolfato		64-67-5	016-027-00-6	T	45-46-20/21/22-34	53-26-44	E
	0,0-Dietil-0-(3,5,6-tricloro-2-piridil)-tiofosfato	n. 312						
416	1,1-Dietossi-etano		105-57-7	605-015-00-1	F-Xi	11-36/38	9-16-33	
	2-((Dietossi-tiofosforilossi)-imino)-2-fenil-acetonitrile	n. 609						
417	Difenamide		957-51-7	616-007-00-2	Xn	20/21/22	2-13	
418	Difenilamina			612-026-00-5	T	23/24/25-33	28-36/37-44	
419	Difenilmetan-4,4'-diisocianato (1), isomeri e omologhi (n=0-4) (2), miscela di (1) e (2)		101-68-8 9016-87-9	615-005-01-6	Xn	20-36/37/38-42	26-28-38-45	
420	Difenilmetan-4,4'-diisocianato(MDI)(1) Difenilmetan-2,4'-diisocianato(MDI)(2) Difenilmetan-2,2'-diisocianato(MDI)(3) Miscele di (1),(2) e (3)		101-68-8 5873-54-1 2536-05-2	615-005-00-9	Xn	20-36/37/38-42	26-28-38-45	C
421	Digitossina		71-63-6	614-022-00-9	T	23/25-33	1-44	
	2,3-Diidro-2,2-dimetil-7-benzofuranil-metilcarbammato	n. 255						
422	1,2-Diidrossibenzene		120-80-9	604-016-00-4	Xn	21/22-36/38	22-26-37	
423	1,3-Diidrossibenzene		108-46-3	604-010-00-1	Xn	22-36/38	26	
424	1,4-Diidrossibenzene		123-31-9	604-005-00-4	Xn	20/22	2-24/25-39	
	Diisobutilchetone	n. 443						

Numero d'ordine	SOSTANZA	Rif. sost.	CAS n.	N. CEE	CLASSIFICAZIONE ED ETICHETTATURA Simb.	R	S	Note
	Diisopropanolamina	n. 628						
	N,N'-Diisopropil-fosforodiamido-fluoruro	n. 739						
425	Dilauroile perossido			617-003-00-3	O-Xi	11-36/37/38	3/7/9-14-27-37/39	
426	Dimefox		115-26-4	015-061-00-9	T	26/27/28	1-13-28-45	
	Dimepranol (DCI)	n. 432						
427	Dimetan		122-15-6	006-010-00-1	T	26/27/28	1-13-45	
428	Dimetilacetale		534-15-6	605-007-00-8	F	11	9-16-33	
429	N,N-Dimetilacetamide		127-19-5	616-011-00-4	Xn	20/21-36	26-28-36	
	O,S-Dimetil-N-acetil-tiofosforamidato	n. 1						
	4-(Dimetilamino)-benzen-diazosolfonato di sodio	n. 570						
	(2-Dimetil-amino-5,6-dimetil-4-pirimidin il)-N,N-dimetilcarbammato	n. 828						
430	2-Dimetilaminoetanolo		108-01-0	603-047-00-0	Xi	10-36/37/38	28	
	2-Dimetilaminoetilamina	n. 102						
431	2-Dimetilaminoetile metacrilato		2867-47-2	607-132-00-3	Xn	21/22-36/38-43	26-28	D
	3-(Dimetilamino-metilene-imino)-fenil-metilcarbammato	n. 596						
	(4-Dimetilamino-3-metil-fenil)-N-metilcarbammato	n. 98						
432	1-Dimetilaminopropan-2-olo		108-16-7	603-077-00-4	C	10-22-34	23-26-36	
	3-(Dimetilamino)-propilamina	n. 440						
	alfa-(4-(4-Dimetilammino-alfa-(4-(etil(3-sodiosulfonatobenzil)ammino)-fenil)benziliden)cicloesa-2,5-dieniliden(etil)ammonio)toluen-3-sulfonato	n. 180						
433	N,N-Dimetilanilina		121-69-7	612-016-00-0	T	23/24/25-33	28-37-44	
(*) 434	3,3'-Dimetilbenzidina		119-93-7	612-041-00-7	T	45-22	53-44	E
435	N,N'-Dimetilbenzidina		8810-74-4	612-043-00-8	Xn	20/21/22	22-36	
(*) 436	3,3'-Dimetilbenzidina sali			612-081-00-5	T	45-22	53-44	A,E
(*) 437	Dimetilcarbamoile cloruro		79-44-7	006-041-00-0	T	45-22-23-36/37/38	53-44	E
438	1)3-(Dimetil-carbamoil-ossi)-5-metil-1H-pirazol-1-il-(N,N-dimetil-carbammide) 2)(3-metil-1H-pirazol-5-il)-N,N-dimetil-carbammato)			006-040-00-5	T	23/24/25	2-13-44	
439	1,4-Dimetilcicloesano		589-90-2	601-019-00-2	F	11	9-16-33	
440	N,N-Dimetil-1,3-diaminopropano			612-061-00-6	C	10-22-34-43	26-36/37/39	
441	Dimetildiclorosilano			014-003-00-X	F-Xi	11-36/37/38		
	N,N-Dimetil-2,2-difenilacetamide	n. 417						
	O,O-Dimetil-O-cis-(2-dimetil-carbamoil-1-metil-vinil)-fosfato	n. 401						
	1,1'-Dimetil-4,4'-dipiridinio	n. 796						
442	Dimetile carbonato		616-38-6	607-013-00-6	F-Xn	11-20/21/22	9-29	
443	2,6-Dimetil-eptan-4-one		108-83-8	606-005-00-X	Xi	10-37	24	
444	Dimetiletere		115-10-6	603-019-00-8	F	13	9-16-33	
	O,O-Dimetil-S-(2-etil-solfinil-etil)-monotio-fosfato	n. 786						
	O,O-Dimetil-S-(2-etiltio-etil)-ditiofosfato	n. 946						
	O,O-Dimetil-O-(2-etiltio-etil)-tiofosfato	n. 339						

Numero d'ordine	SOSTANZA	Rif. sost.	CAS n.	N. CEE	CLASSIFICAZIONE ED ETICHETTATURA			Note
					Simb.	R	S	
	0,0-Dimetil-S-(2-etiltio-etil)-tiofosfato	n. 340						
	0,0-Dimetil-S-(alfa-(etossicarbonil)-benzil)-ditiofosfato	n. 588						
445	N,N-Dimetilfenilendiamina o		2836-03-5	612-031-00-2	T	23/24/25	28-44	C
	m		2836-04-6					
	p		99-98-6					
446	N,N-Dimetilformamide		68-12-2	616-001-00-X	Xn	20/21-36	26-28-36	
	0,0-Dimetil-S-(N-formil-N-metil-carbamoil-metil)-ditiofosfato	n. 597						
	0,S-Dimetil-fosforamidotioato	n. 680						
	0,0-Dimetil-S-ftalimidometil-ditiofosfato	n. 608						
	Dimetilglicol	n. 457						
(*) 447	N,N-Dimetilidrazina		57-14-7	007-012-00-5	F-T	45-11-23/25-34	53-16-33-44	E
448	1,2-Dimetilimidazolo		1739-84-0	613-034-00-1	Xn	22-38-41	24-26	
	0,0-Dimetil-0-cis-(2-N-metilcarbamoil-1-metil-vinil)-fosfato	n. 745						
	0,0-Dimetil-S-2-(1-metil-carbamoil-etiltio)-etil monotiofosfato	n.1007						
	0,0-Dimetil-S-(N-metil-carbamoil)-metil-ditiofosfato	n. 454						
	0,0-Dimetil-S-(N-metil-carbamoil-metil)-tiofosfato	n. 784						
	2,2-Dimetil-3-metilen-norbornano clorurato	n. 252						
	0,0-Dimetil-0-(3-metil-4-metiltio-fenil)-tiofosfato	n. 587						
	0,0-Dimetil-0-(3-metil-4-nitro-fenil)-monotiofosfato	n. 578						
	(3,5-Dimetil-4-metiltio-fenil)-N-metil-carbammato	n. 730						
	0,0-Dimetil-S-((2-metossi-1,3,4(4H)-tiadiazol-5-on-4-il)-metil)-ditiofosfato	n. 684						
	0,0-Dimetil-S-((morfolin-carbonil)-metil)-ditiofosfato	n. 752						
	0,0-Dimetil-0-(4-nitro-fenil)-monotiofosfato	n. 798						
449	Dimetilnitrosamina		62-75-9	612-077-00-3	T+	45-25-26-48	53-45	E
	0,0-Dimetil-S-((4-osso-3H-1,2,3-benzotriazin-3-il)-metil)-ditiofosfato	n. 148						
	(5,5-Dimetil-3-osso-cicloes-1-en-il)-N,N-dimetil-carbammato	n. 427						
450	2,4-Dimetil-3-pentanone		565-80-0	606-028-00-5	F	11	16-23	
	3,5-Dimetil-peridro-1,3,5-tiadiazin-2-tione	n. 333						
451	Dimetilpropano		463-82-1	601-005-00-6	F	13	9-16-33	
452	Dimetilsolfato		77-78-1	016-023-00-4	T+	45-25-26-34	53-26-27-45	E
453	N,N-Dimetiltoluidina			612-056-00-9	T	23/24/25-33	28-36/37-44	C
	0,0-Dimetil-(2,2,2-Tricloro-1-idrossi-etil)-fosfonato	n. 964						
	2,6-Dimetil-4-tridecilmorfolina	n. 982						
454	Dimetoato		60-51-5	015-051-00-4	Xn	20/21/22	2-13	
(*) 455	3,3'-Dimetossibenzidina		119-90-4	612-036-00-X	T	45-22	53-44	E
(*) 456	3,3'-Dimetossibenzidina sali			612-037-00-5	T	45-22	53-44	A,E

Numero d'ordine	SOSTANZA	Rif. sost.	CAS n.	N. CEE	CLASSIFICAZIONE ED ETICHETTATURA Simb.	R	S	Note
457	1,2-Dimetossietano		110-71-4	603-031-00-3	Xn	10-20-19	24/25	
458	Dimexano		1468-37-7	016-024-00-X	Xn	20/21/22	2-13	
	Dimrpranol (DCI)	n. 432						
459	Dinex		131-89-5	609-028-00-3	T	23/24/25	2-13-44	
460	Dinex sali ed esteri			609-029-00-9	T	23/24/25	2-13-44	A
461	2,4-Dinitroanilina		97-02-9	612-040-00-1	T	26/27/28-33	28-36/37-45	
462	Dinitrobenzene		25154-54-5	609-004-00-2	T	26/27/28-33	28-36/37-45	C
	Dinitrobenzolo	n. 462						
463	Dinitroclorobenzene			610-003-00-4	T	23/24/25-33	28-37-44	C
	4,6-Dinitro-o-cresolo	n. 491						
464	Dinitrodiglicol		693-21-0	603-033-00-4	E-T	3-26/27/28-33	33-35-36/37-45	
	0-(2,4-Dinitrofenil)-3,5-dibromc-4-idrossi-benzaldossima	n. 193						
465	Dinitrofenolo		25550-58-7	609-016-00-8	T	23/24/25-33	28-37-44	C
466	Dinitrofenolo sali			609-017-00-3	T	23/24/25-33	28-37-44	A
467	Dinitrotoluene		25321-14-6	609-007-00-9	T	23/24/25-33	28-37-44	C
	Dinitrotoluolo	n. 467						
468	Dinobuton		973-21-7	006-028-00-X	T	23/24/25	2-13-44	
469	Dinocap			609-023-00-6	Xn	20/22	2-13	
470	Dinocton			609-027-00-8	Xn	20/21/22	2-13	
471	Dinosam		4097-36-3	609-033-00-0	T	23/24/25	2-13-44	
472	Dinosam sali ed esteri			609-034-00-6	T	23/24/25	2-13-44	A
473	Dinoseb		88-85-7	609-025-00-7	T	26/27/28	1-13-44	
474	Dinoseb sali ed esteri			609-026-00-2	T	23/24/25	2-13-44	A
475	Dinoterb			609-030-00-4	T	23/24/25	2-13-44	
476	Dinoterb sali ed esteri			609-031-00-X	T	23/24/25	2-13-44	A
	1,4-Diossan-2,3-diil-bis(0,0-dietil-ditiofosfato)	n. 480						
(**) 477	1,4-Diossano		123-91-1	603-024-00-5	F-Xn	11-36/37-40	16-36/37	
	9,10-Diosso-1,4-ditia-antracen-2,3-dicarbonitrile	n. 489						
	(2-(1,3-Diossolan-2-il)-fenile)-N-metil carbammato	n. 479						
478	1,3-Diossolano		646-06-0	605-017-00-2	F	11	16	
479	Dioxacarb			006-029-00-5	T	23/24/25	2-13-44	
480	Dioxathion		78-34-2	015-063-00-X	T	26/27/28	1-13-28-45	
	Dipentene	n. 667						
481	Di-n-propilamina (1) di-isopropilamina (2)		142-84-7 108-18-9	612-048-00-5	F-Xi	11-36/37/38	9-16	
	Dipropilchetone	n. 515						
	Dipropilenglicole etere monobutilico	n. 234						
	Dipropilentriamina	n. 145						
482	Di-n-propiletere e di-isopropiletere		108-20-3	603-045-00-X	F	11-19	9-16-33	
483	Diquat, e i suoi sali		2764-72-9	613-005-00-3	T	26/27/28	1-13-45	A
484	Distillati di petrolio e di catrame di carbon fossile(se il punto di infiammabilita' e' inferiore a 21 C); vedere anche 650-001-00-0			650-001-01-8	F	11	9-16-29-33	
485	Distillati di petrolio e di catrame di carbon fossile(se il punto di infiammabilita' e' compreso tra 21 C e 55 C); vedere anche 650-001-00-0			650-001-02-5		10		

Numero d'ordine	SOSTANZA	Rif. sost.	CAS n.	N. CEE	CLASSIFICAZIONE ED ETICHETTATURA Simb.	R	S	Note
486	Distillati di petrolio e di catrame di carbon fossile(eccetto quelli utilizzati come carburanti) corrispondenti a miscel e complesse di idrocarburi. Considerando la composizione variabile di questi prod otti, la loro classificazione ed etichet tatura sono regolate dal DM 17/10/1984(G. Uff. n. 311 12/11/1984)			650-001-00-0	F	10		
487	Disul		136-78-7	016-025-00-5	Xn	20/21/22	2-13	
488	Disulfoton		298-04-4	015-060-00-3	T	26/27/28	1-13-28-45	
489	Dithianon			613-021-00-0	Xn	20/21/22	2-13	
	1,3-Ditiolo(4,5,b)-chinossalin-2-tione	n. 944						
490	Diuron		330-54-1	006-015-00-9	Xi	36/37/38	2-13	
491	DNOC		534-52-1	609-020-00-X	T	26/27/28-33	1-13-28-45	
492	DNOC sale di ammonio			609-022-00-0	T	26/27/28-33	1-13-28-45	
493	DNOC sale di potassio, DNOC sale di sodio			609-021-00-5	T	23/24/25-33	2-13-44	
	Dodecilguanidina acetato	n. 494						
494	Dodina		2439-10-3	607-076-00-X	Xn	20/21/22	2-13	
495	Drazoxolon		570-76-7	650-008-00-9	T	23/24/25	2-13	
496	Efedrina			614-023-00-4	Xn	22	22-25	
497	Efedrina sali			614-024-00-X	Xn	22	22-25	A
498	Endosulfan		115-29-7	602-052-00-5	T	23/24/25-36/ 38	2-13-44	
499	Endothal-sodio		129-67-9	607-055-00-5	T	23/24/25	2-13-44	
500	Endothion		2778-04-3	015-049-00-3	T	23/24/25	2-13-44	
501	Endrin		72-20-8	602-051-00-X	T	26/27/28	1-13-28-45	
	Epicloridrina	n. 298						
502	EPN		2104-64-5	015-036-00-2	T	26/27/28	1-13-28-45	
	3,6-Epossi-cicloesan-1,2-dicarbossilato disodico	n. 499						
	(Epossietil)benzene	n. 915						
503	1-Epossietil-3,4-epossicicloesano		4223-10-3	603-066-00-4	T	23/24/25-40	23-24-44	
504	1,2-Epossi-3-fenossipropano		122-60-1	603-067-00-X	Xn	21-43	24/25	
	1,2-Epossipropano	n. 863						
505	1,3-Epossipropano		503-30-0	603-058-00-0	F-Xn	11-20/21/22	9-16-26-29	
506	2,3-Epossi-1-propanolo		556-52-5	603-063-00-8	T	23-21/22-36/37/ 38-42/43	44	
507	2,3-Epossipropile acrilato		106-90-1	607-117-00-1	T	23/24/25-34-43	26-36/37/39-44	D
508	2,3-Epossipropile metacrilato		106-91-2	607-123-00-4	Xn	20/21/22-36/38- 43	26-28	D
509	1,2-Epossi-3-tolilossi-propano		26447-14-3	603-056-00-X	Xi	38	26-28	C
	(Epossoetil)benzene	n. 915						
(*) 510	Eptacloro		76-44-8	602-046-00-2	T	24/25-33-40	36/37-44	
	1,4,5,6,7,8,8-Eptacloro-3a,4,7,7a-tetra idro-4,7-metano-indene	n. 510						
	1,4,5,6,7,8,8-Eptacloro-2,3-epossi-3a,4, 7,7a-tetraidro-4,7-metanoindano	n. 511						
(*) 511	Eptacloro epossido		1024-57-3	602-063-00-5	T	25-33-40	36/37-44	
512	Eptano		142-82-5	601-008-00-2	F	11	9-16-23-29-33	C
513	2-Eptanone		110-43-0	606-024-00-3	Xn	10-22	23	
514	3-Eptanone		106-35-4	606-003-00-9	Xn	10-20-36	24	
515	4-Eptanone		123-19-3	606-027-00-X		10	23	
516	EPTC		759-94-4	006-030-00-0	Xn	20/21/22	2-13	
517	Erbon		136-25-4	607-077-00-5	Xn	20/21/22-36/37	2-13	

Numero d'ordine	SOSTANZA	Rif. sost.	CAS n.	N. CEE	CLASSIFICAZIONE ED ETICHETTATURA Simb.	R	S	Note
	1,2,3,4,10,10-Esacloro-1,4,4a,5,8,8a-esaidro-1,4-endo-5,8-endo-dimetano-naftalene	n. 640						
	6,7,8,9,10,10-Esacloro-1,5,5a,6,9,9a-esaidro-6,9-metano-2,3,4-benzo(e)-diossatiepina-3-ossido	n. 498						
	1,2,3,4,5,6-Esaclorocicloesano	n. 614						
	gamma-1,2,3,4,5,6-Esacloro-cicloesano	n. 647						
	1,2,3,4,10,10-Esacloro-6,7-epossi-1,4,4a,5,6,7,8,8a-ottaidro-1,4-endo-5,8-endo-dimetano-naftalene	n. 501						
	Esaclorofene	n. 705						
518	Esafluoropropene		116-15-4	602-061-00-4	Xn	20-37	41	
519	Esafluosilicati alcalini (Na,K,NH4)			009-012-00-0	T	23/24/25	1/2-26-41-	A
520	Esafluosilicati, esclusi quelli espressamente indicati in questo allegato			009-013-00-6	Xn	22	2-13-24/25	A
521	Esametilen-1,6-diisocianato		822-06-0	615-011-00-1	T	23-36/37/38-42/43	26-28-38-45	
(*) 522	Esametilfosforo triamide		680-31-9	015-106-00-2	T	45-46	53-44	
523	1,6-Esandiol diacrilato			607-109-00-8	Xi	36/38-43	39	D
	Esanitrodifenilamina	n. 190						
(**) 524	n-Esano		110-54-3	601-037-00-0	F-Xn	11-20-48	9-16-24/25-29-51	
525	1-Esanolo		111-27-3	603-059-00-6	Xn	22	24/25	
(**) 526	Esano, miscela di isomeri (contenente piu' di 5% di n-Esano)			601-007-01-4	F-Xn	11-20-48	9-16-24/25-29-51	
527	Esano-miscela di isomeri contenente un massimo di 5% di n-Esano		110-54-5	601-007-00-7	F	11	9-16-23-29-33	C
(**) 528	2-Esanone		591-78-6	606-030-00-6	F-T	11-23-48	9-16-29-44-51	
529	Eserina		57-47-6	614-020-00-8	T	26/28	1-25-45	
530	Eserina sali			614-021-00-3	T	26/28	1-25-45	A
(**) 531	Estratti aromatici di distillati (derivati del petrolio e coperti dai N. EINECS 2651021 2651037 2651042 2651110)		64742-03-6 /04-7/05-8 /11-6	650-011-00-5	T	45	53-44	
	Etanale	n. 2						
532	Etano		74-84-0	601-002-00-X	F	12	9-16-33	
	Etanolamina	n. 101						
533	Etanolo		64-17-5	603-002-00-5	F	11	7-16	
	Etantiolo	n. 562						
534	Etere etilico		60-29-7	603-022-00-4	F	12-19	9-16-29-33	
535	Ethion		563-12-2	015-047-00-2	T	23/24/25	2-13-44	
536	Ethoxyquin			613-014-00-2	Xn	20/21/22	2-13	
537	Etilamina		75-04-7	612-002-00-4	F-Xi	13-36/37	16-26-29	
	2-Etilamino-4-isopropilamino-6-metiltio-1,3,5-triazina	n. 89						
538	N-Etilanilina		103-69-5	612-053-00-2	T	23/24/25-33	28-37-44	
539	Etilati alcalini		16331-64-9	603-041-00-8	F-C	11-14-34	8-16-26-43	A
540	Etilbenzene		100-41-4	601-023-00-4	F-Xn	11-20	16-24/25-29	
541	2-Etilbutanolo		97-95-0	603-051-00-2	Xn	21/22		
	S-(N-Etil-carbamoil-metil)-O,O-dimetil-ditiofosfato	n. 566						
	Etil-cicloesil glicidil etere	n. 542						
542	1-(2-Etilcicloesilossi)-2,3-epossipropano			603-068-00-5	Xi	36/38-43	26-28-37/39	
543	Etildimetilamina		598-56-1	612-076-00-8	F+-C	12-20/22-34	3-16-26-36	

Numero d'ordine	SOSTANZA	Rif. sost.	CAS n.	N. CEE	Simb.	R	S	Note
						CLASSIFICAZIONE ED ETICHETTATURA		
	S-Etil-N,N-dipropil-tiocarbammato	n. 516						
544	Etile acetato		141-78-6	607-022-00-5	F	11	16-23-29-33	
545	Etile acrilato		140-88-5	607-032-00-X	F-Xi	11-20/22-36/37/ 38-43	9-16-33	D
546	Etile bromoacetato			607-069-00-1	T	26/27/28	7/9-26-45	
	Etile bromuro	n. 197						
547	Etile cloroacetato			607-070-00-7	T	23/24/25	7/9-44	
548	Etile cloroformiato		541-41-3	607-020-00-4	F-T	11-23-36/37/38	9-16-33-44	
	Etile cloruro	n. 741						
	Etile-5-(1,2,3,5,6,7,8,9,10,10-decacloro -4-idrossi-(5.2.1.0(2,6).0(3,9).0(5,8))- pentaciclo-dec-4-il)levulinato	n. 645						
549	Etile formiato		109-94-4	607-015-00-7	F	11	9-16-33	
550	Etile lattato		97-64-3	607-129-00-7		10	23	
551	Etile metacrilato		97-63-2	607-071-00-2	F-Xi	11-36/37/38-43	9-16-29-33	D
	N,N'-Etilen-bis(ditiocarbammato di sodio)	n. 753						
	Etilendiamina	n. 352						
	1,1-Etilen-2,2'-dipiridinio	n. 483						
552	Etilene		74-85-1	601-010-00-3	F	13	9-16-33	
	Etilene dibromuro	n. 361						
	Etilene dicloruro	n. 380						
(*) 553	Etilene ossido		75-21-8	603-023-00-X	F+-T	45-46-13-23-36/ 37/38	53-3/7/9-16-33- 44	E
554	Etilenglicol dimetacrilato			607-114-00-5	Xi	36/37		D
	Etilenglicol dimetiletere	n. 457						
	Etilenglicol dinitrato	n. 773						
	Etilenglicol monobutiletere	n. 231						
	Etilenglicol monobutiletere acetato	n. 232						
	Etilenglicol monoetiletere	n. 568						
	Etilenglicol monoetiletere acetato	n. 569						
	Etilenglicol monoisopropiletere	n. 644						
	Etilenglicol monometiletere	n. 732						
	Etilenglicol monometiletere acetato	n. 733						
555	Etilenimina		151-56-4	613-001-00-1	F-T	11-26/27/28-40	9-29-36-45	D
556	Etile nitrato			007-007-00-8	E	2	23-24/25	
557	Etile nitrito		109-95-5	007-006-00-2	E-Xn	2-20/21/22		
(**) 558	Etilentiourea		96-45-7	613-039-00-9	Xn	47-22	53	E
	Etile ossalato	n. 413						
559	Etile propionato		105-37-3	607-028-00-8	F	11	16-23-29-33	
560	2-Etilesile acrilato		103-11-7	607-107-00-7	Xi	37/38-43		D
561	Etile silicato		78-10-4	014-005-0	Xn	10-20-36/37		
	O-Etil-S-fenil-etil-ditiofosfonato	n. 591						
	Etilglicol	n. 568						
	Etilglicol acetato	n. 569						
	Etilidene cloruro	n. 379						
562	Etilmercaptano		75-08-1	016-022-00-9	7-Xn	11-20	16-25	
	Etilmetilchetossima	n. 211						
563	Etil-metil-etere		540-67-0	603-020-00-3	F	13	9-16-33	
	O-Etil-O-(4-nitro-fenil)-fenil-tiofosfo nato	n. 502						
564	S-2-Etil-sulfinil-etil-O,O-dimetil-ditio fosfato			015-065-00-0	T	26/27/28	1-13-28-45	
565	S-2-Etil-sulfinil-isopropil-O,O-dimetil- monotiofosfato			015-075-00-5	T	23/24/25	2-13-44	

Numero d'ordine	SOSTANZA	Rif. sost.	CAS n.	N. CEE	CLASSIFICAZIONE ED ETICHETTATURA Simb.	R	S	Note
	S-(2-Etil-sulfonil-etil)-O,O-dimetiltiofosfato	n. 341						
	O-Etil-O-(2,4,5-triclorofenil)etiltiofosfonato	n. 971						
	Etino	n. 4						
566	Etoatometil		116-06-8	015-089-00-1	Xn	20/21/22	2-13	
567	2-Etossianilina 4-etossianilina		94-70-2 156-43-4	612-039-00-6	T	23/24/25-33	28-36/37-45	C
568	2-Etossietanolo		110-80-5	603-012-00-X	Xi	10-36	24	
569	2-Etossietil acetato		111-15-9	607-037-00-7	Xn	10-20/21	24	
	6-Etossi-2,2,4-trimetil-1,2-diidrochinolina	n. 536						
570	Fenaminosulf		140-56-7	611-003-00-7	T	23/24/25	2-13-44	
571	Fenazaflor			613-015-00-8	Xn	20/21/22	2-13	
572	Fenclorfos		299-84-3	015-052-00-X	Xn	20/21/22	2-13	
	o-Fenetidina e p-fenetidina	n. 567						
	Fenil-5,6-dicloro-2-trifluorometil-1-benzimidazolcarbossilato	n. 571						
573	Fenilendiamina		25265-76-3	612-028-00-6	T	23/24/25-43	28-44	C
574	m-Fenilendiamina dicloridrato (1) p-fenilendiamina dicloridrato (2)		541-69-5 624-18-0	612-029-00-1	T	23/24/25	28-44	C
575	Fenilidrazina		100-63-0	612-023-00-9	T	23/24/25-36	28-44	
	Fenilossirano	n. 915						
576	1-Fenil-3-pirazolidone		92-43-3	606-022-00-2	Xn	22		
	S-(2-Fenilsolfonamido-etil)-O,O-diisopropil-ditiofosfato	n. 161						
577	6-Fenil-1,3,5-triazin-2,4-diamina		91-76-9	613-038-00-3	Xn	22		
578	Fenitrotion		122-14-5	015-054-00-0	Xn	20/21/22	2-13	
579	Fenkapton		2275-14-1	015-037-00-8	T	23/24/25	2-13-44	
580	Fenolo		108-95-2	604-001-00-2	T	24/25-34	2-28-44	
581	Fenoprop		93-72-1	607-047-00-1	Xn	20/21/22	2-13	
582	Fenoprop sali			607-048-00-7	Xn	20/21/22	2-13	A
583	Fenson		80-38-6	650-003-00-1	Xn	20/21/22	2-13	
584	Fensulfothion		115-90-2	015-090-00-7	T	26/27/28	1-13-28-45	
585	Fentin acetato			050-003-00-6	T	23/24/25	2-13-44	
586	Fentin idrossido			050-004-00-1	T	23/24/25	2-13-44	
587	Fention		55-38-9	015-048-00-8	Xn	20/21/22-36/38	2-13	
588	Fentoato		2597-03-7	015-097-00-5	Xn	20/21/22	2-13	
	Fisostigmina	n. 529						
589	Fluenetil			607-078-00-0	T	26/27/28	1-13-28-45	
590	Fluoro		7782-41-4	009-001-00-0	T	7-26-35	7/9-36-45	
	2-Fluoroetil-2-(4-bifenilil)-acetato	n. 589						
591	Fonofos		944-22-9	015-091-00-2	T	26/27/28	1-13-45	
592	Forate		298-02-2	015-033-00-6	T	26/27/28	1-13-28-45	
(*) 593	Formaldeide conc. sup. o uguale a 25%		50-00-0	605-001-01-5	T	23/24/25-34-40-43	26-36/37-44-51	B,D
(*) 594	Formaldeide conc. sup. o uguale a 1% e inf. a 5%		50-00-0	605-001-02-X	Xn	40-43	23-37	B
(*) 595	Formaldeide conc. sup. o uguale a 5% e nf. a 25%		50-00-0	605-001-01-2	Xn	20/21/22-36/37/38-40-43	26-36/37-51	B
	Formalina conc.sup. a 30%	n. 595						
596	Formetanato			006-031-00-6	T	26/27/28	1-13-45	
597	Formothion		2540-82-1	015-057-00-7	Xn	20/21/22	2-13	
598	Fosalone			015-067-00-1	T	23/24/25	2-13-44	
599	Fosfamidone		297-99-4	015-022-00-6	T	26/27/28	1-13-28-45	

Numero d'ordine	SOSTANZA	Rif. sost.	CAS n.	N. CEE	CLASSIFICAZIONE ED ETICHETTATURA Simb.	R	S	Note
600	Fosforo bianco		12185-10-3	015-001-00-1	F-T	17-26/28-35	5-26-28-45	
	Fosforo giallo	n. 600						
601	Fosforo ossicloruro		10025-87-3	015-009-00-5	C	34-37	7/8-26	
602	Fosforo pentacloruro		10026-13-8	015-008-00-X	C	34-37	7/8-26	
603	Fosforo pentasolfuro		1314-80-3	015-104-00-1	F-Xn	11-20/22-29		
604	Fosforo rosso			015-002-00-7	F	11-16	7-43	
605	Fosforo tribromuro		7789-60-8	015-103-00-6	C	14-34-37	26	
606	Fosforo tricloruro		7719-12-2	015-007-00-4	C	34-37	7/8-26	
607	Fosforo trisolfuro		1314-85-8	015-012-00-1	F-Xn	11-22	7-16-24/25	
	Fosgene	n. 256						
608	Fosmet		732-11-6	015-101-00-5	Xn	20/21/22	2-13	
609	Foxim			015-100-00-X	Xn	20/21/22	2-13	
610	Fuberidazole			613-016-00-3	Xn	20/21/22	2-13	
	Furfurolo	n. 76						
	2-(2'-Furil)-benzimidazolo	n. 610						
	Glicerina trinitrato	n. 772						
	Glicidile acrilato	n. 507						
	Glicidile metacrilato	n. 508						
611	Glicol etilenico		107-21-1	603-027-00-1	Xn	22	2	
612	Gliossale...%		107-22-2	605-016-00-7	Xi	36/38	26-28	B
	Glucocloral	n. 283						
613	Guanidinio cloruro		50-01-1	607-148-00-0	Xn	22-36/38	22	
(*) 614	HCH		608-73-1	602-042-00-0	T	21-25-40	22-36/37-44	C
	HEOD 85%	n. 404						
615	Idrazina		302-01-2	007-008-00-3	T	10-26/27/28-34-40	36/37/39-45	
616	Idrazina soluzione conc.compresa tra 5% e 64%			007-008-01-0	C	24/25-34-40	36/37/39	B
	Idrochinone	n. 424						
617	Idrogeno		1333-74-0	001-001-00-9	F	12	7/9	
618	Idrogeno perossido soluzione conc.compresa tra 20% e 60%			008-003-01-6	C	34	28-39	B
619	Idrogeno perossido soluzione conc. sup. a 60%		7722-84-1	008-003-00-9	O-C	8-34	3-28-36/39	B
620	Idrogeno solforato		7783-06-4	016-001-00-4	F-T	13-26	7/9-25-45	
621	8-Idrossichinolina solfato		134-31-6	613-017-00-9	Xn	20/21/22	2-13	
	1-Idrossicicloesile perossido	n. 188						
	4-Idrossi-3,5-diiodo-benzonitrile	n. 635						
622	2-Idrossietile acrilato		818-61-1	607-072-00-8	T	24-34-43	26-36/39-44	D
623	2-Idrossietile metacrilato		868-77-9	607-124-00-X	Xi	36/38-43	26-28	D
624	1-Idrossi-1-idroperossi-dicicloesile perossido			617-009-00-6	E-C	3-35	3/7/9-14-27-34-37/39	
625	4-Idrossi-4-metil-pentan-2-one		123-42-2	603-016-00-1	Xi	36	24/25	
	4-Idrossi-3-(3-osso-1-fenil-butil)-cumarina	n.1012						
	4-Idrossi-3-(3-osso-1-(2-furil)butil)-cumarina	n. 324						
	5-(alfa-Idrossi-alfa-(2-piridil)-benzil)-7-(alfa-(2-piridil)-benziliden)-norborn-5-en-2,3-dicarbossimide	n. 781						
626	Idrossipropile acrilato (miscela di isomeri)		999-61-1	607-108-00-2	T	23/24/25-34-43	26-36/39-44	D
627	Idrossipropile metacrilato (miscela di isomeri)			607-125-00-5	Xi	36/38	26-28	D

Numero d'ordine	SOSTANZA	Rif. sost.	CAS n.	N. CEE	CLASSIFICAZIONE ED ETICHETTATURA Simb.	R	S	Note
	4-Idrossi-3-(1,2,3,4-tetraidro-1-naftil)-cumarina	n. 326						
	Imidazolidin-2-tione	n. 558						
628	1,1'-Iminodi-2-propanolo		110-97-4	603-083-00-7	Xi	36	26	
629	Iodio		7553-56-2	053-001-00-3	Xn	20/21	23-25	
	Iodometano	n. 702						
630	3-Iodopropene			602-054-00-6	C	10-34	7-26	
631	Iodossibenzene		696-33-3	053-003-00-4	E	1	35	
632	Iodossibenzoato di calcio			053-004-00-X	E	1	35	C
633	Iosciamina		101-31-5	614-012-00-4	T	26/28	1-24-45	
634	Iosciamina sali			614-013-00-X	T	26/28	1-24-45	A
635	Ioxinil		1689-83-4	608-007-00-6	T	23/24/25	1-13-44	
	Ipoazotide e azoto tetrossido	n. 152						
636	Isobenzan		297-78-9	602-053-00-0	T	26/27/28-36/38	1-13-44	
	Isobutanolamina	n. 104						
637	Isobutile acrilato		106-63-8	607-115-00-0	Xn	10-20/21-38-43	9	D
638	Isobutile metacrilato		97-86-9	607-113-00-X	Xi	10-36/37/38-43		D
639	Isobutirrile cloruro		79-30-1	607-140-00-7	F-C	11-35	16-23-26-36	
	4-Isocianatosulfonil-toluene	n. 955						
640	Isodrin		465-73-6	602-050-00-4	T	26/27/28	1-13-28-45	
	Isoforon diamina	n. 105						
641	Isoforon diisocianato		4098-71-9	615-008-00-5	T	23-36/37/38-42/43	26-28-38-45	
	Isoforone	n. 991						
642	Isolan		119-38-0	006-009-00-6	T	26/27/28	1-13-45	
	Isopentano e pentano	n. 807						
	Isoprene	n. 690						
	Isopropanolamina	n. 107						
643	Isopropenilbenzene		98-83-9	601-027-00-6	Xi	10-36/37		
	Isopropilamina	n. 106						
	2-Isopropilamino-4-metilamino-6-metiltio-1,3,5-triazina	n. 343						
	Isopropilbenzene e propilbenzene	n. 858						
	3-Isopropil-1H,3H,2,1,3-benzotiodiazin-4-one-2,2-diossido	n. 162						
	O-Isopropil-ditiocarbonato di sodio	n. 869						
	Isopropile acetato e propile acetato	n. 860						
	Isopropile formiato e propile formiato	n. 861						
	N-Isopropil-N-fenil-2-cloroacetamide	n. 849						
	Isopropilglicol	n. 644						
	3-Isopropil-5-metil-fenile-N-metilcarbammato	n. 848						
	(1-Isopropil-3-metil-1H-pirazol-5-il)-N,N-dimetil-carbammato	n. 642						
644	2-Isopropossi-etanolo		109-59-1	603-013-00-5	Xn	20/21-36	24/25	
	2-Isopropossi-fenil-N-metil-carbammato	n. 867						
645	Kelevan			607-079-00-6	Xn	20/21/22	2-13	
646	Leptophos			015-093-00-3	T	23/24/25-39	2-13-44	
647	Lindano		58-89-9	602-043-00-6	T	23/24/25-36/38	2-13-44	
648	Linuron			006-021-00-1	Xi	38	2-13	
649	Litio			003-001-00-4	F-C	14/15-34	8-43	
650	Litio-alluminio idruro		16853-85-3	001-002-00-4	F	15	7/8-24/25-43	
651	Magnesio alchili			012-003-00-4	F-C	14-17-34	16-43	A
652	Magnesio fosfuro		12057-74-8	015-005-00-3	F-T	15/29-28	1/2-22-43-45	
653	Magnesio in polvere (piroforica)		7439-95-4	012-001-00-3	F	15-17	7/8-43	

Numero d'ordine	S O S T A N Z A	Rif. sost.	CAS n.	N. CEE	CLASSIFICAZIONE ED ETICHETTATURA Simb.	R	S	Note
654	Magnesio in polvere (stabilizzata) o trucioli			012-002-00-9	F	11-15	7/8-43	
655	Malation		121-75-5	015-041-00-X	Xn	20/21/22	2-13	
656	Malononitrile		109-77-3	608-009-00-7	T	23/24/25	23-27	
657	Manganese biossido		1313-13-9	025-001-00-3	Xn	20/22	25	
658	Mannitol-esanitrato		130-39-2	603-036-00-0	E	3	35	
659	MCPA			607-051-00-3	Xn	20/21/22	2-13	
660	MCPA sali ed esteri			607-052-00-9	Xn	20/21/22	2-13	A
661	MCPB		94-81-5	607-053-00-4	Xn	20/21/22	2-13	
662	MCPB sali ed esteri			607-054-00-X	Xn	20/21/22	2-13	A
	MDI	n. 420						
663	Mecarbam		2595-54-2	015-045-00-1	T	23/24/25	2-13-44	
664	Mecoprop			607-049-00-2	Xn	20/21/22	2-13	
665	Mecoprop sali			607-050-00-8	Xn	20/21/22	2-13	A
666	Menazone		78-57-9	015-053-00-5	Xn	20/21/22	2-13	
667	p-Menta-1,8(9)-diene		138-86-3	601-029-00-7	Xi	10-38	28	
668	8-p-Mentanile idroperossido			617-012-00-2	O-C	11-35	3/7/9-14-27-37/39	
	p-Mentano idroperossido	n. 668						
669	Mephosfolan			015-094-00-9	T	26/27/28	1-13-28-45	
670	Mercurio		7439-97-6	080-001-00-0	T	23-33	7-44	
671	Mercurio alchili			080-007-00-3	T	26/27/28-33	2-13-28-36-45	A
672	Mercurio cloruro oso		10112-91-1	080-003-00-1	Xn	22	2	
673	Mercurio composti inorganici escluso il solfuro di mercurio (cinabro) e quelli espressamente indicati in questo allegato			080-002-00-6	T	26/27/28-33	1/2-13-28-45	A
674	Mercurio composti organici, esclusi quelli espressamente indicati in questo allegato			080-004-00-7	T	26/27/28-33	2-13-28-36-45	A
675	Mercurio fulminato		20820-45-5	080-005-00-2	E-T	23/24/25-33	3-34-35-44	
676	Mercurio ossicianuro		1335-31-5	080-006-00-8	E-T	23/24/25-33	28-35-44	
677	Mesitilene		108-67-8	601-025-00-5	Xi	10-37		
	Mesitile ossido	n. 719						
678	Metacrilati, esclusi quelli espressamente indicati in questo allegato			607-134-00-4	Xi	36/37/38	26-28	
	Metacrilonitrile	n. 724						
679	Metaldeide		108-62-3	605-005-00-7	Xn	10-20/22	2-24/25	
	Metallile cloruro	n. 305						
680	Metamidophos			015-095-00-4	T	26/27/28	1-13-28-45	
681	Metam-sodio		137-42-8	006-013-00-8	Xn	22-38	2-13	
682	Metano		74-82-8	601-001-00-4	F	12	9-16-33	
683	Metanolo		67-56-1	603-001-00-X	F-T	11-23/25	2-7-16-24	
	Metantiolo	n. 712						
684	Metidation		950-37-8	015-069-00-2	T	26/27/28	1-13-45	
685	Metilamina mono		74-89-5	612-001-00-9	F-Xi	13-36/37	16-26-29	C
	di		124-40-3					
	tri		75-50-3					
686	2-Metilaminoetanolo		109-83-1	603-080-00-0	C	34	23-26-36	
687	N-Metilanilina		100-61-8 121-69-7	612-015-00-5	T	23/24/25-33	28-37-44	
688	Metilati alcalini		3315-60-4	603-040-00-2	F-C	11-14-34	8-16-26-43	A
689	2-Metilaziridina		75-55-8	613-033-00-6	F-T+	45-11-26/27/28-41	53-26-45	E
	Metilazossimetile acetato	n. 715						

Numero d'ordine	SOSTANZA	Rif. sost.	CAS n.	N. CEE	CLASSIFICAZIONE ED ETICHETTATURA Simb.	R	S	Note
	O-Metil-O-(4-bromo-2,5-diclorofenil)-fenil-tiofosfonato	n. 646						
690	2-Metilbutan-1,3-diene		78-79-5	601-014-00-5	F	12	9-16-29-33	D
	Metilbutano	n. 807						
691	2-Metilbutan-2-olo		75-85-4	603-007-00-2	F-Xn	11-20	9-16-24/25	
692	3-Metil-2-butanone		563-80-4	606-007-00-0	F	11	9-16-33	
	Metil-n-butilchetone	n. 528						
	6-(1-Metilbutil)-2,4-dinitrofenolo	n. 471						
693	Metilcicloesano		108-87-2	601-018-00-7	F	11	9-16-33	
694	2-Metilcicloesanolo		583-59-5	603-010-00-9	Xn	20	24/25	
695	2-Metilcicloesanone		583-60-8	606-011-00-2	Xn	10-20	25	
	Metilcloroformio	n. 966						
	N-Metildietanolamina	n. 710						
	N-Metil-ditiocarbammato di sodio	n. 681						
696	Metile acetato		79-20-9	607-021-00-X	F	11	16-23-29-33	
697	Metile acetoacetato		105-45-3	607-137-00-0	Xi	36	26	
698	Metile acrilato		96-33-3	607-034-00-0	F-Xi	11-20/22-36/37/38	9-16-33	D
699	Metile bromuro		74-83-9	602-002-00-3	T	26	1/2-7/9-24/25-27-45	
	Metile-2-cloro-3-p-clorofenil-propionato	n. 262						
700	Metile cloroformiato		79-22-1	607-019-00-9	F-T	11-23-36/37/38	9-16-33-44	
	Metile cloruro	n. 302						
701	Metile formiato		107-31-3	607-014-00-1	F	12	9-16-33	
(*) 702	Metile ioduro		74-88-4	602-005-00-9	T	21-23/25-37/38-40	36/37-38-44	
703	Metile isocianato		624-83-9	615-001-00-7	F-T	12-23/24/25-36/37/38	9-30-43-44	
704	Metile lattato		547-64-8	607-092-00-7		10	23	
	4,4'-Metilenbis(2-cloroanilina)	n. 388						
	4,4'-Metilenbis(2-cloroanilina) sali	n. 389						
	Metilen-S,S'-bis(O,O-dietil-ditiofosfato)	n. 535						
	3,3'-Metilen-bis(4-idrossi-cumarina)	n. 402						
705	2,2'-Metilen-bis-(3,4,6-triclorofenolo)		70-30-4	604 015-00-9	T	24/25	20-37-44	
	Metilene bromuro	n. 362						
	Metilene cloruro	n. 387						
	Metile ossido	n. 444						
706	Metile propionato		554-12-1	607-027-00-2	F	11	16-23-29-33	
707	5-Metil-3-aptanone		541-85-5	606-020-00-1	Xi	10-36/37	23	
708	5-Metil-2-esanone		110-12-3	606-026-00-4		10	23	
	N-Metiletanolamina	n. 606						
	Metiletilchetone	n. 210						
	Metilglicol	n. 732						
	Metilglicol acetato	n. 733						
709	1-Metilimidazolo		616-47-7	613-035-00-7	C	21/22-34	26-36	
710	2,2'-Metiliminodietanolo		105-59-9	603-079-00-5	Xi	36	24	
	Metilisobutilcarbinolo	n. 717						
	Metilisobutilchetone	n. 718						
	Metilisopropilchetone	n. 692						
711	Metilisotiocianato		556-61-6	615-002-00-2	Xn	10-20/22	24/25	
712	Metilmercaptano		74-93-1	016-021-00-3	F-Xn	13-20	16-25	
713	Metilmetacrilato		80-62-6	607-035-00-6	F-Xi	11-36/37/38-43	9-16-29-33	D
	N-Metil-1-naftil-carbammato	n. 253						
(**) 714	1-Metil-3-nitro-1-nitrosoguanidina		70-25-7	612-083-00-6	T	45-20-36/38	53-44	E

Numero d'ordine	SOSTANZA	Rif. sost.	CAS n.	N. CEE	CLASSIFICAZIONE ED ETICHETTATURA Simb.	R	S	Note
(**) 715	Metil-ONN-azossimetile acetato		592-62-1	611-004-00-2	T	45-47	53-44	
	7-(N-Metil-ossicarbamoil)-2-metil-2,3-diidrobenzofurano	n. 337						
	Metilossirano	n. 863						
716	2-Metil-2,4-pentandiolo		107-41-5	603-053-00-3	Xi	36/38		
717	4-Metilpentan-2-olo		108-11-2	603-008-00-8	Xi	10-37	24/25	
718	4-Metil-pentan-2-one		108-10-1	606-004-00-4	F	11	9-16-23-33	
719	4-Metilpent-3-en-2-one		141-79-7	606-009-00-1	Xn	10-20/21/22	25	
	2)(3-Metil-1H-pirazol-5-il)-N,N-dimetil-carbammato 1)3-(dimetil-carbamoil-ossi)-5-metil-1H-pirazol-1-il-(N,N-dimetil-carbammide)	n. 438						
720	2-Metilpiridina		109-06-8	613-036-00-2	Xn	10-20/21/22-36/37	26-36	
721	4-Metilpiridina		108-89-4	613-037-00-8	T	10-20/22-24-36/37/38	26-36-44	
722	N-Metil-2-pirrolidone		872-50-4	606-021-00-7	Xi	36/38	41	
723	2-Metilpropan-2-olo		75-65-0	603-005-00-1	F-Xn	11-20	9-16	
724	2-Metil-2-propene nitrile		126-98-7	608-010-00-2	F-T	11-23/24/25-43	9-16-18-29-45	D
	[6-(1-Metil-propil)-2,4-dinitro-fenil]-3 3-dimetil-acrilato	n. 183						
	6-(1-Metilpropil)-2,4-dinitrofenolo	n. 473						
	alfa-Metilstirene	n. 643						
725	o-Metilstirene		611-15-4	601-028-00-1	Xn	20	24	
726	N-Metil-N-2,4,6-tetranitroanilina		479-45-8	612-017-00-6	E-T	2-23/24/25-33	35-44	
	2-Metil-2-tiometil-propionaldeid-O-(N-metil-carbamoil)-ossima	n. 77						
727	N-Metiltoluidina			612-055-00-3	T	23/24/25-33	28-36/37-44	C
728	Metiltriclorosilano		75-79-6	014-004-00-5	F-Xi	11-14-36/37/38	26-39	
729	Metil-vinil-etere		107-25-5	603-021-00-9	F	13	9-16-33	D
730	Metiocarb			006-023-00-2	T	23/24/25	2-13-44	
731	2-Metossi-anilina		90-04-0	612-035-00-4	T	26/27/28-33	28-36/37-45	C
	4-metossi-anilina		104-94-0					
	(2-Metossicarbonil-1-metil-vinil)dimetil-fosfato	n. 738						
732	2-Metossietanolo		109-86-4	603-011-00-4	Xn	10-20/21/22-37	24/25	
733	2-Metossietil-acetato		110-49-6	607-036-00-1	Xn	10-20/21	24	
	S-(N-(2-Metossietil)-carbamoil-metil)-O,O-dimetil-ditiofosfato	n. 90						
734	4-Metossi-4-metil-2-pentanone		107-70-0	606-023-00-8		10	23	
735	4-Metossi-2-nitroanilina		96-96-8	612-038-00-0	T	26/27/28-33	28-36/37-45	
	S-((5-Metossi-4H-piron-2-il)-metil)-O,O-dimetil-tiofosfato	n. 500						
736	1-Metossi-2-propanolo		107-98-2	603-064-00-3		10	24	
737	Metoxuron		19937-59-8	006-033-00-7	Xn	20/21/22	2-13	
738	Mevinfos		298-01-1	015-020-00-5	T	26/27/28	1-13-28-45	
739	Mipafox		371-86-8	015-062-00-4	T	26/27/28-39	1-13-45	
	Monobromometano	n. 699						
740	Monoclorobenzene		108-90-7	602-033-00-1	Xn	10-20	24/25	
741	Monocloroetano		75-00-3	602-009-00-0	F	13	9-16-33	
	Monoclorometano	n. 302						
742	Monocloropentano		2965-63-1	602-022-00-1	F-Xn	11-20/21/22	9-29	C
743	Monocloropropano		540-54-5	602-018-00-X	F-Xn	11-20/21/22	9-29	C

Numero d'ordine	S O S T A N Z A		Rif. sost.	CAS n.	N. CEE	CLASSIFICAZIONE ED ETICHETTATURA Simb.	R	S	Note
744	Monoclorotoluene	o		95-49-8	602-040-00-X	Xn	20	24/25	C
		m		108-41-8					
		p		106-43-4					
745	Monocrotophos			6923-22-4	015-072-00-9	T	26/27/28	1-13-28-45	
746	Monofluoroacetamide			640-19-7	616-002-00-5	T	26/27/28	1/2-20-22-26-45	
747	Monofluoroacetati solubili				607-082-00-2	T	28	1/2-20-22-26-45	A
748	Monolinuron				006-032-00-1	Xn	20/21/22	2-13	
(**) 749	Monuron			150-68-5	006-042-00-6	Xn	22-40	36/37	
750	Morfamquat ed i suoi sali				613-018-00-4	Xn	20/21/22	2-13	A
751	Morfolina			110-91-8	613-028-00-9	C	10-20/21/22-34	23-36	
752	Morphotion			144-41-2	015-058-00-2	T	23/24/25	2-13-44	
753	Nabam			142-59-6	006-014-00-3	Xn	22-30	2-13	
754	2-Naftilamina			91-59-8	612-022-00-3	T	45-22	53-44	E
	beta-Naftilamina		n. 754						
	alfa-Naftilamina (contenente 1% e piu' di 2-naftilamina)		n. 755						
755	1-Naftilamina (contenente 1% e piu' di 2-naftilamina)			134-32-7	612-021-00-8	T	26/27/28-39	22-27-36-45	
	alfa-Naftilamina (contenente meno di 1% di 2-naftilamina)		n. 756						
756	1-Naftilamina (contenente meno di 1% di 2-naftilamina)			134-32-7	612-020-00-2	Xn	20/21/22-33	22-36	
757	2-Naftilamina sali				612-071-00-0	T	45-22	53-44	A E
758	Naftilen-1,5-diisocianato			3173-72-6	615-007-00-X	Xn	20-36/37/38-42	26-28-38-45	
	2-(1-Naftil)-indan-1,3-dione		n. 759						
759	Naftilindandione				606-015-00-4	T	25	2-13-44	
	1-(1-Naftil)-2-tiourea		n. 137						
	1-Naftiltiourea		n. 137						
760	2-Naftolo			135-19-3	604-007-00-5	Xn	20/22	24/25	
	beta-Naftolo		n. 760						
761	Naled			300-76-5	015-055-00-6	Xn	20/21/22-36/37	2-13	
	N(2)-(4-Cloro-o-tolil)-N(1), N(1)-dimetilformamidina, cloridrato		n. 287						
	N(2)-(4-Cloro-o-tolil)-N(1),N(1)-dimetil formamidina		n. 286						
	N2-(4-Cloro-o-tolil)-N1,N1-dimetilformamidina		n. 286						
	N2-(4-cloro-o-tolil)-N1,N1-dimetilformamidina, cloridrato		n. 287						
	Neopentano		n. 451						
762	Nichel carbonile			13463-39-3	028-001-00-1	F-T	11-26-40	9-23-45	
763	Nicotina			54-11-5	614-001-00-4	T	26/27/28	1-13-28-45	
764	Nicotina sali				614-002-00-X	T	26/27/28	1-13-28-45	A
	Nitrile butirrico		n. 229						
765	5-Nitroacenaftene			602-87-9	609-037-00-2	T	45	53-44	
766	Nitroanilina	o		99-09-2	612-012-00-9	T	23/24/25-33	28-36/37-44	C
		m		88-74-4					
		p		100-01-6					
	2-Nitro-p-anisidina		n. 735						
767	Nitrobenzene			98-95-3	609-003-00-7	T	26/27/28-33	28-36/37-45	
	Nitrobenzolo		n. 767						
768	Nitrocellulosa contenente non piu' del 12,6% d'azoto				603-037-01-8	F	11	16-33-37/39	
769	Nitrocellulosa contenente piu' del 12,6 % d'azoto			9004-70-0	603-037-00-6	E	1-3	35	

Numero d'ordine	SOSTANZA	Rif. sost.	CAS n.	N. CEE	CLASSIFICAZIONE ED ETICHETTATURA Simb.	R	S	Note
770	Nitroetano		79-24-3	609-035-00-1	Xn	10-20/22	9-25-41	
771	4-Nitrofenolo		100-02-7	609-015-00-2	Xn	20/21/22-33	28	
	p-Nitrofenolo	n. 771						
772	Nitroglicerina		55-63-0	603-034-00-X	E-T	3-26/27/28-33	33-35-36/37-45	
773	Nitroglicol		628-96-6	603-032-00-9	E-T	2-26/27/28-33	33-35-36/37-45	
	Nitromannite	n. 658						
774	Nitrometano		75-52-5	609-036-00-7	Xn	5-10-22	41	
(*) 775	2-Nitronaftalene		581-89-5	609-038-00-8	T	45	53-44	
776	1-Nitropropano		108-03-2	609-001-00-6	Xn	10-20/21/22	9	
777	2-Nitropropano		79-46-9	609-002-00-1	T	45-10-20/22	53-9-44	E
778	4-Nitrosoanilina		659-49-4	612-011-00-3	Xn	20/21/22	25-28	
	N-Nitrosodimetilamina	n. 449						
779	2-Nitrotoluene (1) e 4-nitrotoluene (2)		88-72-2 99-99-0	609-006-00-3	T	23/24/25-33	28-37-44	C
780	Nitrotoluidina		28676-13-3	612-025-00-X	T	23/24/25-33	28-36/37-44	C
	o-Nitrotoluolo (1) p-nitrotoluolo (2)	n. 779						
781	Norbormide		991-42-4	650-004-00-7	T	23/24/25	2-13-44	
782	2-Norbornile acrilato		10027-06-2	607-121-00-3	Xn	21-38-43	28	D
783	Oleum (conc. SO3 compresa tra 20% e 65%)			016-019-00-2	C	14-35-37	26-30	B
784	Ometoato			015-066-00-6	T	23/24/25	2-13-44	
785	Osmio tetrossido		20816-12-0	076-001-00-5	T	26/27/28-34	7/9-26-45	
786	Ossidemeton metile		301-12-2	015-046-00-7	T	23/24/25	2-13-44	
787	Ossidietilen bis(cloroformiato)		106-75-2	607-141-00-2	Xn	22-38-41	23-26	
788	Ossido di bis(clorometile)		542-88-1	603-046-00-5	T+	45-10-22-24-26	53-45	E
	Ossido rameoso	n. 871						
789	Ossigeno liquido		7782-44-7	008-001-00-8	O	8-34	21	
	Ossirano	n. 553						
	1,3,4,5,6,7,8,8-Ottacloro-1,3,3a,4,7,7a-esaidro-4,7-endo-metan-isobenzofurano	n. 636						
	1,2,4,5,6,7,8,8-Ottacloro-3a-4,7,7a-tetraidro-4,7-metanoindano	n. 285						
	Ottametil-difosforamide	n. 874						
790	Ottano		111-65-9	601-009-00-8	F	11	9-16-29-33	C
	4-Ottil-2,6-dinitrofenile crotonato e 6-ottil-2,4-dinitrofenile crotonato miscela di isomeri	n. 469						
	4-Ottil-2,6-dinitrofenile metilcarbonato e 6-ottil-2,4-dinitrofenile metilcarbonato miscela di isomeri	n. 470						
791	Oubaina		36-06-6	614-025-00-5	T	23/25-33	44	
792	Oxidisulfoton		2497-07-6	015-096-00-X	T	26/27/28	1-13-45	
793	Papaverina		58-74-2	614-018-00-7	Xn	22	22	
794	Papaverina sali			614-019-00-2	Xn	22	22	A
795	Paraldeide		123-63-7	605-004-00-1	F	11	9-16-29-33	
796	Paraquat e suoi sali		1910-42-5	613-006-00-9	T	26/27/28	1-13-45	A
797	Paration		56-38-2	015-034-00-1	T	26/27/28	1-13-28-45	
798	Paration-metile		298-00-0	015-035-00-7	T	26/27/28	1-13-28-45	
	PCB	n. 830						
799	Pebulate		1114-71-2	006-034-00-2	Xn	20/21/22	2-13	
800	Pentacloroetano		76-01-7	602-017-00-4	T	26/27	1-38-45	
801	Pentaclorofenolo		87-86-5	604-002-00-8	T	23/24/25	28-36/39-44	
802	Pentaclorofenolo sali alcalini			604-003-00-3	T	23/24/25	28-36/39-44	A
803	Pentacloronaftalina			602-041-00-5	Xn	21/22-36/38	35	C

Numero d'ordine	SOSTANZA	Rif. sost.	CAS n.	N. CEE	CLASSIFICAZIONE ED ETICHETTATURA Simb.	R	S	Note
804	Pentaeritritol tetraacrilato			607-122-00-9	Xi	36/38-43	26-39	D
805	Pentaeritritol triacrilato		3524-68-3	607-110-00-3	Xi	36/38-43	39	D
	Pentaetilenesamina	n. 928						
806	2,4-Pentandione		123-54-6	606-029-00-0	Xn	10-22	21-23-24/25	
807	Pentano (1) ed isopentano (2)		109-66-0 78-78-4	601-006-00-1	F	11	9-16-29-33	
808	3-Pentanone		96-22-0	606-006-00-5	F	11	9-16-33	
	Pentrite	n. 942						
	Percloroetilene	n. 931						
	Perfluoropropene	n. 518						
809	Phosacetim		4104-14-7	015-092-00-8	T	26/27/28	1-13-28-45	
810	Phosniclor			015-043-00-0	Xn	20/21/22	2-13	
	2-Picolina	n. 720						
	4-Picolina	n. 721						
811	Picrati			609-010-00-5	E-T	3-23/24/25	28-35-37-44	A
812	Pilocarpina		92-13-7	614-016-00-6	T	26/28	1-25-45	
813	Pilocarpina sali			614-017-00-1	T	26/28	1-25-45	A
814	2-Pinanile idroperossido			617-005-00-4	O-C	11-35	3/7/9-14-27-37 /39	
	Pinano idroperossido	n. 814						
815	Pindone		83-26-1	606-016-00-X	T	25	2-13-44	
816	Piombo alchili			082-002-00-1	T	26/27-28-33	13-26-36/37-45	A
817	Piombo azoturo		13424-46-9	082-003-00-7	E-Xn	3-20/22-33	33-34-35	
818	Piombo composti, esclusi quelli espressamente indicati in questo allegato			082-001-00-6	Xn	20/22-33	13-20/21	A
819	Piombo esafluosilicato		1310-03-8	009-014-00-1	Xn	20/22-33	13-20/21-24/25	
820	Piombo 2,4,6-trinitroresorcinato		17994-50-6	609-019-00-4	E-Xn	3-20/22-33	33-34-35	
821	Piperazina		110-85-0	612-057-00-4	C	34	26-36	
822	Piperidina		110-89-4	613-027-00-3	F-T	11-23/24-34	16-26-27-44	
823	Pirazoxon		108-34-9	015-023-00-1	T	26/27/28	1-13-28-45	
824	Piretrina I		121-21-1	613-023-00-1	Xn	20/21/22	2-13	
825	Piretrina II		121-29-9	613-024-00-7	Xn	20/21/22	2-13	
826	Piretrine,comprese le cinerine			613-022-00-6	Xn	20/21/22	2-13	
827	Piridina		110-86-1	613-002-00-7	F-Xn	11-20/21/22	26-28	
828	Pirimicarb		23103-98-2	006-035-00-8	T	23/24/25	2-13-44	
829	Pirimifos-etile		5221-49-8	015-099-00-6	T	23/24/25	2-13-44	
	Pirocatecolo	n. 422						
	Pirogallolo	n. 989						
830	Policlorodifenili			602-039-00-4	Xn	33	35	C
831	Polietilenamina			612-065-00-8	C	21/22-34-43	26-36/37/39	
	Potassa caustica	n. 839						
	Potassa caustica soluzione conc.compresa tra 1% e 5%	n. 840						
	Potassa caustica soluzione conc. sup. a 5%	n. 841						
832	Potassio		7440-09-7	019-001-00-2	F-C	14/15-34	5-8-43	
833	Potassio bicromato		7778-50-9	024-002-00-6	Xi	36/37/38-43	22-28	
834	Potassio bifluoruro		7789-29-9	009-008-00-9	C	25-34	22-26-37	
835	Potassio bromato		7758-01-2	035-003-00-6	O	9	24/25-27	
836	Potassio clorato			017-004-00-3	O-Xn	9-20/22	2-13-16-27	
837	Potassio cromato		7789-00-6	024-006-00-8	Xi	36/37/38-43	22-28	
838	Potassio fluoruro		7789-23-3	009-005-00-2	T	23/24/25	1/2-26-44	
839	Potassio idrossido		1310-58-3	019-002-00-8	C	35	2-26-37/39	
840	Potassio idrossido soluzione conc.compresa tra 1% e 5%			019-002-02-2	Xi	36/38	2-26	B

Numero d'ordine	SOSTANZA	Rif. sost.	CAS n.	N. CEE	CLASSIFICAZIONE ED ETICHETTATURA Simb.	R	S	Note
841	Potassio idrossido soluzione conc. sup. a 5%			019-002-01-5	C	35	2-26-27-37/39	B
842	Potassio nitrito		7558-09-0	007-011-00-X	O-T	8-25	44	
843	Potassio perclorato		7778-74-7	017-008-00-5	O-Xn	9-22	2-13-22-27	
844	Potassio permanganato		7722-64-7	025-002-00-9	O-Xn	8-22	2	
845	Potassio polisolfuri			016-007-00-7	C	31-34	26	
846	Potassio solfuro		1312-73-8	016-006-00-1	C	31-34	26	
847	Prodotto di reazione: Bisfenolo-A-epicloridrina. Resine epossidiche(peso molecolare medio minore o uguale a 700)		25068-38-6	603-074-00-8	Xi	36/38-43	28-37/39	
848	Promecarb			006-037-00-9	T	23/24/25	2-13-44	
849	Propaclor		1918-16-7	616-008-00-8	Xn	20/21/22-36	2-13	
850	Propanale		123-38-6	605-018-00-8	F-Xi	11-36/37/38	9-16-29	
851	Propanil			616-009-00-3	Xn	20/21/22	2-13	
852	Propano		74-98-6	601-003-00-5	F	13	9-16-33	
(*) 853	3-Propanolide		57-57-8	606-031-00-1	T+	45-26-36/38	53-45	E
854	1-Propanolo e 2-propanolo		71-23-8 67-63-0	603-003-00-0	F	11	7-16	C
(*) 855	1,3-Propansultone		1120-71-4	016-032-00-3	T	45-21/22	53-44	E
856	2-Propenale		107-02-8	605-008-00-3	F-T	11-23-36/37/38	29-33-44	D
857	2-Propen-1-olo		107-18-6	603-015-00-6	F-T	11-26-36/37/38	16-39-45	
858	Propilbenzene ed isopropilbenzene		98-82-8	601-024-00-X	Xi	10-37		
	S-Propil-N-butil-N-etiltiocarbammato	n. 799						
859	n-Propil cloroformiato		109-61-5	607-142-00-8	T	10-23-34	26-36-44	
860	Propile acetato (1) ed isopropile acetato (2)		109-60-4 108-21-4	607-024-00-6	F	11	16-23-29-33	C
	Propile bromuro	n. 200						
	Propile cloruro	n. 743						
861	Propile formiato (1) ed isopropile formiato		625-55-8 110-74-7	607-016-00-2	F	11	9-16-33	C
862	Propilene		115-07-1	601-011-00-9	F	13	9-16-33	
(**) 863	Propilene ossido		75-56-9	603-055-00-4	F+-T	45-12-20/21/22-36/37/38	53-3/7/9-16-33-44	E
	Propilenimina	n. 689						
864	n-Propile propionato		106-36-5	607-030-00-9		10		
865	Prop-2-in-1-olo		107-19-7	603-078-00-X	T	10-23/24/25-34	26-28-36-44	
	1,3-Propiolattone	n. 853						
866	Propionile cloruro		79-03-8	607-093-00-2	F-C	11-14-34	9-16-26	
867	Propoxur		114-26-1	006-016-00-4	T	23/24/25	2-13-44	
868	Protoato		2275-18-5	015-032-00-0	T	26/27/28	1-13-45	
869	Proxan-sodio			006-024-00-8	Xn	22-38	2-13	
870	Rame (I) cloruro		7758-89-6	029-001-00-4	Xn	22	22	
871	Rame (I) ossido		1317-39-1	029-002-00-X	Xn	22	22	
872	Rame naftenato		1338-02-9	029-003-00-5	Xn	10-22		
	Resorcina	n. 423						
873	Rotenone		83-79-4	650-005-00-2	T	23/24/25	2-13-44	
	(1R,4S,4aS,5R,6R,7S,8S,8aR)-1,2,3,4,10,10-esacloro-6,7-epossi-1,4,4a,5,6,7,8,8a-ottaidro-1,4:5,8-dimetanonaftalene	n. 404						
	(1R,4S,4aS,5S,8R,8aR)-1,2,3,4,10,10-Esacloro-1,4,4a,5,8,8a-esaidro-1,4:5,8-dimetanonaftalene	n. 78						
	Sale di cromo dell'acido cromico (VI)	n. 319						

Numero d'ordine	SOSTANZA	Rif. sost.	CAS n.	N. CEE	CLASSIFICAZIONE ED ETICHETTATURA Simb.	R	S	Note
874	Schradan		152-16-9	015-026-00-8	T	26/27/28	1-13-28-45	
875	Scopolamina		51-34-3	614-014-00-5	T	26/27/28	1-25-45	
876	Scopolamina sali			614-015-00-0	T	26/27/28	1-25-45	A
877	Selenio			034-001-00-2	T	23/25-33	20/21-28-44	
878	Selenio composti tranne il solfoseleniur ro di cadmio			034-002-00-8	T	23/25-33	20/21-28-44	A
879	Silicio tetracloruro		10026-04-7	014-002-00-4	Xi	14-36/37/38	7/8-26	
	Soda caustica anidra	n. 888						
	Soda caustica soluzione conc.compresa tr a 1% e 5%	n. 889						
	Soda caustica soluzione conc. sup. a 5%	n. 890						
880	Sodio		7440-23-5	011-001-00-0	F-C	14/15-34	5-8-43	
881	Sodio azoturo		26628-22-8	011-004-00-7	T	28-32	28	
882	Sodio bicromato		10588-01-9	024-004-00-7	Xi	36/37/38-43	22-28	
883	Sodio bifluoruro			009-007-00-3	C	25-34	22-26-37	
884	Sodio carbonato		497-19-8 24551-51-7	011-005-00-2	Xi	36	22-26	
885	Sodio clorato		7775-09-9	017-005-00-9	O-Xn	9-20/22	2-13-16-27	
	Sodio-4-(dimetilamino)-benzene-diazosolf onato	n. 570						
886	Sodio fluoruro		7681-49-4	009-004-00-7	T	23/24/25	1/2-26-44	
887	Sodio idrosolfito		7775-14-6	016-028-00-1	Xn	7-22-31	7/8-26-28-43	
888	Sodio idrossido anidro		1310-73-2	011-002-00-6	C	35	2-26-37/39	
889	Sodio idrossido soluzione conc.compresa tra 1% e 5%			011-002-02-0	Xi	36/38	2-26	B
890	Sodio idrossido soluzione conc. sup. a 5%			011-002-01-3	C	35	2-26-27-37/39	B
891	Sodio idruro		7646-69-7	001-003-00-X	F	15	7/8-24/25-43	
892	Sodio ipoclorito soluzione conc. Cl attivo sup. a 10%			017-011-00-1	C	31-34	2-28	B
893	Sodio ipoclorito soluzione conc. Cl attivo compresa tra 5% e 10%			017-011-01-9	Xi	31-36/38	2-25	B
894	Sodio nitrito		7632-00-0	007-010-00-4	O-T	8-25	44	
895	Sodio perclorato		7601-89-0	017-010-00-6	O-Xn	9-22	2-13-22-27	
896	Sodio perossido		1313-60-6	011-003-00-1	O-C	8-35	8-27-39	
897	Sodio polisolfuri			016-010-00-3	C	31-34	26	
898	Sodio solfuro		1313-82-2	016-009-00-8	C	31-34	26	
	Sodio-p-toluen-N-clorosulfamide	n. 284						
899	Solfonitrica miscela con conc. HNO3 sup. a 30%			007-005-00-7	O-C	8-35	23-26 30-36	B
900	Solforile cloruro		7791-25-5	016-015-00-6	C	14-34-37	26	
901	Stagno tetracloruro		7646-78-8	050-001-00-5	C	34-37	7/8-26	
902	Stagno tributile,composti,esclusi quelli espressamente indicati in questo allegato			050-008-00-3	T	23/24/25	26-27-28-44	A
903	Stagno tributile linoleato			050-015-00-1	Xn	20/21/22	26-28	
904	Stagno tributile naftenato			050-016-00-7	Xn	20/21/22	26-28	
905	Stagno tributile oleato			050-014-00-6	Xn	20/21/22	26-28	
906	Stagno tricicloesile,composti,esclusi quelli espressamente indicati in questo allegato			050-012-00-5	Xn	20/21/22	26-28	A
907	Stagno triesile,composti,esclusi quelli espressamente indicati in questo allegato			050-010-00-4	Xn	20/21/22	26-28	A

Numero d'ordine	SOSTANZA	Rif. sost.	CAS n.	N. CEE	CLASSIFICAZIONE ED ETICHETTATURA Simb.	R	S	Note
908	Stagno trietile,composti,esclusi quelli espressamente indicati in questo allegato			050-006-00-2	T	26/27/28	26-27-28-45	A
	Stagno trifenile acetato	n. 585						
909	Stagno trifenile ,composti,esclusi quelli espressamente indicati in questo allegato			050-011-00-X	T	23/24/25	26-27-28-44	A
	Stagno trifenile idrossido	n. 586						
910	Stagno trimetile,composti,esclusi quelli espressamente indicati in questo allegato			050-005-00-7	T	26/27/28	26-27-28-45	A
911	Stagno triottile,composti,esclusi quelli espressamente indicati in questo allegato			050-013-00-0	Xi	36/37/38		A
912	Stagno tripentile,composti,esclusi quelli espressamente indicati in questo allegato			050-009-00-9	Xn	20/21/22	26-28	A
913	Stagno tripropile,composti,esclusi quelli espressamente indicati in questo allegato			050-007-00-8	T	23/24/25	26-27-28-44	A
(**) 914	Stirene		100-42-5	601-026-00-0	Xn	10-20-36/38	23	D
(**) 915	Stirene ossido		96-09-3	603-084-00-2	T	45-21-36	53-44	E
916	Stricnina		57-24-9	614-003-00-5	T	26/28	1-13-45	
917	Stricnina sali			614-004-00-0	T	26/28	1-13-28-45	A
918	Strofantina-K			614-026-00-0	T	23/25-33	44	
919	Stronzio cromato		7789-06-2	024-009-00-4	T	45-22	53-44	E
(**) 920	Sulfallate		95-06-7	006-038-00-4	T	45-22	53-44	E
	4,4'-Sulfonildianilina	n. 332						
921	Sulfotep		3689-24-5	015-027-00-3	T	26/27/28	1-13-28-45	
922	2,4,5-T		93-76-5	607-041-00-9	Xn	20/21/22-40	2-13	
923	Tallio		7440-28-0	081-001-00-3	T	26/28-33	2-13-28-45	
924	Tallio composti			081-002-00-9	T	26/28-33	2-13-28-45	A
925	TCA		650-51-1	607-005-00-2	Xn	22	24/25	
	TDI	n. 951						
926	TEPP		107-49-3	015-025-00-2	T	26/27/28	1-13-28-45	
927	2,4,5-T esteri e,sali			607-042-00-4	Xn	20/21/22-40	2-13	A
928	3,6,9,12-Tetraazatetradecano-1,14-diamina		4067-16-7	612-064-00-2	C	34-43	26-36/37/39	
929	1,1,2,2-Tetrabromoetano		79-27-6	602-016-00-9	T	26-36	1-24-27-45	
930	1,1,2,2-Tetracloroetano		79-34-5	602-015-00-3	T	26/27	2-38-45	
(**) 931	Tetracloroetilene		127-18-4	602-028-00-4	Xn	40	23-36/37	
932	2,3,4,6-Tetraclorofenolo		58-90-2	604-013-00-8	T	25-36/38	26-28-37-44	
933	Tetraclorometano		56-23-5	602-008-00-5	T	26/27	2-38-45	
934	2,3,5,6-Tetracloro-4-(metilsulfonil)piridina			613-032-00-0	Xn	21/22-36-43	26/28	
	0,0,0,0-Tetraetil-ditio-pirofosfato	n. 921						
	Tetraetilenepentamina	n. 961						
	Tetraetil-pirofosfato	n. 926						
935	Tetraidrofurano		109-99-9	603-025-00-0	F-Xi	11-19-36/37	16-29-33	
936	Tetraidro-2-furilmetanolo		97-99-4	603-061-00-7	Xi	36	39	
937	1,2,3,4-Tetraidro-1-naftile-idroperossido			617-004-00-9	0-C	11-35	3/7/9-14-27-37/39	
938	Tetraidrotiofene 1,1-diossido		126-33-0	016-031-00-8	Xn	22	25	
	Tetralina idroperossido	n. 937						
939	N,N,N',N'-Tetrametil-p-fenilendiamina		100-22-1	612-032-00-8	Xn	20/21/22	28	

Numero d'ordine	SOSTANZA	Rif. sost.	CAS n.	N. CEE	CLASSIFICAZIONE ED ETICHETTATURA Simb.	R	S	Note
	N,N,N',N'-Tetrametil-fosforodiamido-fluoruro	n. 426						
	Tetrametiltiourame disolfuro	n. 949						
940	1,2,3,4-Tetranitrocarbazolo		28483-24-9	613-003-00-2	E-Xn	1-20/21/22	35	
941	Tetranitronaftalina			609-014-00-7	E-Xn	2-20/21/22-33	35	C
942	Tetranitropentaeritrite		78-11-5	603-035-00-5	E	3	35	
943	O,O,O,O-Tetrapropile ditiopirofosfato		3244-90-4	015-081-00-8	Xn	20/21/22	2-13	
	Tetrile	n. 726						
944	Thioquinox		93-75-4	613-019-00-X	Xn	20/22	2-13-24	
	Tiocarbamide	n. 948						
	2,2'-Tiodietanolo	n. 945						
945	Tiodiglicol		111-48-8	603-081-00-6	Xi	36		
946	Tiometon		640-15-3	015-050-00-9	T	23/24/25	2-13-44	
947	Tionile cloruro		7719-09-7	016-015-00-0	C	14-34-37	26	
(*) 948	Tiourea		62-56-6	612-082-00-0	Xn	22-40	22-24	
949	Tiram		137-26-8	006-005-00-4	Xn	22-38	2-13	
950	Titanio tetracloruro		7550-45-0	022-001-00-5	C	14-34-36/37	7/8-26	
	TNT	n.1001						
	2-Tolidina	n. 434						
	o-Tolidina	n. 434						
	o-Tolidina sali	n. 436						
951	2,4-Toluen-diisocianato (1)		584-84-9	615-006-00-4	T	26-36/37/38-42	26-28-38-45	C
	2,6-Toluen-diisocianato (2)		91-08-7					
	Miscele di (1) e (2)							
(**) 952	Toluene		108-88-3	601-021-00-3	F-Xn	11-20	16-25-29-33	
953	Toluidina		26915-12-8	612-024-00-4	T	23/24/25-33	28-36/37-44	C
954	m-Toluilendiamina solfato (1)			612-030-00-7	Xn	20/21/22	28	C
	p-toluilendiamina solfato (2)		6369-59-1					
955	Tosilisocianato		4083-64-1	615-012-00-7	Xi	14-36/37/38-42	26-28-30	
	Toxafene	n. 252						
956	Trementina olio		8006-64-2	650-002-00-6	Xn	10-20/21/22	2	
957	Trialchilborani			005-004-00-6	F-C	17-34	7-23-26-36-43	A
958	Triallate		2303-17-5	006-039-00-X	Xn	20/22	2-13	
959	Triamifos		1031-47-6	015-024-00-7	T	26/27/28	1-13-45	
960	Triarimol			603-043-00-9	Xn	20/22	2-13	
961	3,6,9-Triazaundecan-1,11-diamino		112-57-2	612-060-00-0	C	21/22-34-43	26-36/37/39	
	1,2,4-Triazol-3-ilamina	n. 108						
962	Tribromometano		75-25-2	602-007-00-X	T	23-36/38	28-44	
	Tributil-(2,4-diclorobenzil)-fosfonio	n. 263						
963	Tributilfosfato		126-73-8	015-014-00-2	Xn	22	25	
	Tricicloesilstagno idrossido	n. 279						
964	Triclorfon		52-68-6	015-021-00-0	Xn	20/21/22	2-13	
	Tricloroacetato sale sodico	n. 925						
965	Tricloroacetonitrile		545-06-2	608-002-00-9	T	23/24/25	44	
	S-(2,3,3-Tricloro-allil)-diisopropil-tiocarbammato	n. 958						
	2,2,2-Tricloro-1,1-bis(4-cloro-fenil)-etanolo	n. 400						
	1,1,1-Tricloro-2,2-bis(4-clorofenil)etano	n. 336						
(**) 966	1,1,1-Tricloroetano		71-55-6	602-013-00-2	Xn	20	24/25	F
967	1,1,2-Tricloroetano		79-00-5	602-014-00-8	Xn	20/21/22	9	
(**) 968	Tricloroetilene		79-01-6	602-027-00-9	Xn	40	23-36/37	
	1,2-O-(R)-(2,2,2-Tricloro-etiliden)-glucofuranosio	n. 283						

Numero d'ordine	SOSTANZA	Rif. sost.	CAS n.	N. CEE	CLASSIFICAZIONE ED ETICHETTATURA Simb.	R	S	Note
	O-(2,4,5-Tricloro-fenil)-O,O-dimetiltiofosfato	n. 572						
969	2,4,5-Triclorofenolo (1)		95-95-4	604-012-00-2	Xn	22-36/38	26-28	
	2,4,6-triclorofenolo (2)		88-06-2					
	2-(2,4,5-Triclorofenossi)-etil-2,2-dicloropropionato	n. 517						
(**) 970	Triclorometano		67-66-3	602-006-00-4	Xn	20/22-38-40-48	36/37	
971	Tricloronato		327-98-0	015-098-00-0	T	28/27/28	1-13-45	
972	Tricloronitrometano		76-06-2	610-001-00-3	T	26/27/28-36/37/38	26-36-45	
973	1,2,3-Tricloropropano		96-18-4	602-062-00-X	Xn	20/21/22	37/39	D
974	Triclorosilano		10025-78-2	014-001-00-9	F	15-17	24/25-43	
975	Tricloro-s-triazina-2,4,6-trione		87-90-1	613-031-00-5	O-Xn	8-22-31-36/37	8-26-41	
976	alfa,alfa,alfa-Triclorotoluene		98-07-7	602-038-00-9	Xn	20	24/25	
977	2,4,6-Tricloro-1,3,5-triazina		108-77-0	613-009-00-5	Xi	36/37/38	28	
978	Tricresilfosfati(miscele contenenti piu'del 1% di ortocresolo esterificato)			015-017-00-9	T	23/24/25-39	20/21-28-44	
979	Tricresilfosfati (miscele non contenenti piu'del 1% di ortocresolo esterificato)			015-018-00-4	Xn	21/22	28	
980	Tricresilfosfato (o-o-o,o-o-m,o-o-p,o-m-m,o-m-p,o-p-p)		1330-78-5	015-015-00-8	T	23/24/25-39	20/21-28-44	C
981	Tricresilfosfato (m-m-m,.m-m-p,m-p-p,p-p-p)			015-016-00-3	Xn	21/22	28	C
982	Tridemorph			613-020-00-5	Xn	20/21/22	2-13	
983	2,4,6-Tri(dimetil-aminometil)fenolo		90-72-2	603-069-00-0	Xn	22-36/38	26-28	
	Trielina	n. 968						
984	Trietilamina		121-44-8	612-004-00-5	F-Xi	11-36/37	16-26-29	
985	Trietilenglicole diacrilato			607-126-00-0	Xi	36/38-43	26-28	D
	Trietilentetramina	n. 357						
986	Trietilfosfato		78-40-0	015-013-00-7	Xn	22	25	
987	Trifenil fosfito		101-02-0	015-105-00-7	Xi	36/38	28	
988	alfa,alfa,alfa-Trifluorotoluene		98-08-8	602-056-00-7	F	11	16-23	
989	1,2,3-Triidrossibenzene		87-66-1	604-009-00-6	Xn	20/21/22		
	2-(Trimetil-acetil)-indan-1,3-dione	n. 815						
990	Trimetil borato		121-43-7	005-005-00-1	Xn	10-21	23-25	
991	3,5,5-Trimetil-2-cicloesen-(1)-one		78-59-1	606-012-00-8	Xi	36/37/38	26	
992	2,2,4-Trimetilesametilen-1,6-diisocianato (1)		16938-22-0	615-010-00-6	T	23-36/37/38-42	26-28-38-45	C
	2,4,4-Trimetilesametilen-1,6-diisocianato(2)		15646-96-5					
	Miscela di (1) e (2)							
993	Trimetilolpropan triacrilato		15625-89-5	607-111-00-9	Xi	36/38-43	39	D
994	2,4,4-Trimetil-1-pentene			601-031-00-8	F	11	9-16-29-33	
995	2,4,6-Trinitroanisolo		606-35-3	609-011-00-0	E-Xn	2-20/21/22	35	
996	Trinitrobenzene		25377-32-6	609-005-00-8	E-T	2-26/27/28-33	35-45	C
	Trinitrobenzolo	n. 996						
997	Trinitroclorobenzene			610-004-00-X	E-T	2-26/27/28	35-45	C
998	Trinitrocresolo		28905-71-7	609-012-00-6	E-Xn	2-4-20/21/22	35	C
999	2,4,6-Trinitrofenolo		88-89-1	609-009-00-X	E-T	2-4-23/24/25	28-35-37-44	
1000	2,4,6-Trinitroresorcinolo		82-71-3	609-018-00-9	E-Xn	2-4-20/21/22	35	
1001	2,4,6-Trinitrotoluene		118-96-7	609-008-00-4	E-T	2-23/24/25-33	35-44	
1002	Trinitroxilene		28652-33-7	609-013-00-1	E-Xn	2-20/21/22-33	35	C
	Trinitroxilolo	n.1002						
1003	1,3,5-Triossano		110-88-3	605-002-00-0	Xn	22	24/25	
	Triossimetilene	n.1003						

Numero d'ordine	S O S T A N Z A	Rif. sost.	CAS n.	N. CEE	CLASSIFICAZIONE ED ETICHETTATURA Simb.	R	S	Note
1004	Tris(2-cloroetil)fosfato		115-96-8	015-102-00-0	Xi	22-36/38		
1005	Uranio			092-001-00-8	T	26/28-33	20/21-45	
1006	Uranio composti			092-002-00-3	T	26/28-33	20/21-45	A
1007	Vamidotion		2275-23-2	015-059-00-8	T	23/24/25	2-13-44	
1008	Vanadio pentossido		1314-62-1	023-001-00-8	Xn	20	22	
1009	Vinile acetato		108-05-4	607-023-00-0	F	11	16-23-29-33	D
1010	Vinile bromuro		593-60-2	602-024-00-2	F	13	9-16-33	
(**)1011	Vinile cloruro		75-01-4	602-023-00-7	F-T	45-13	53-9-16-44	D
	Vinilidene cloruro	n. 381						
	2-Viniltoluene	n. 725						
1012	Warfarin		81-81-2	607-056-00-0	T	26/27/28	1-13-44	
(**)1013	m-Xilene		108-38-3	601-039-00-1	Xn	10-20/21-38	25	
(**)1014	o-Xilene		95-47-6	601-038-00-6	F-Xn	11-20/21-38	16-25-29	
(**)1015	p-Xilene		106-42-3	601-040-00-7	Xn	10-20/21-38	25	
(**)1016	Xilene, miscela di isomeri (se il punto di infiammabilita' e' inferiore a 21 C)		1330-20-7	601-022-00-9	F-Xn	11-20/21-38	16-25-29	
(**)1017	Xilene, miscela di isomeri (se il punto di infiammabilita' e' sup. o uguale a 21 C)		1330-20-7	601-022-01-6	Xn	10-20/21-38	25	
1018	Xilenolo		1300-71-6	604-006-00-X	T	24/25-34	2-28-44	C
1019	Xilidina		1300-73-8	612-027-00-0	T	23/24/25-33	28-36/37-44	C
1020	Zinco alchili			030-004-00-8	F-C	14-17-34	16-43	A
1021	Zinco cloruro		7646-85-7	030-003-00-2	C	34	7/8-28	
1022	Zinco cromati, compresi il cromato di zinco e potassio			024-007-00-3	T	45-22-43	53-44	A E
1023	Zinco fosfuro		1314-84-7	015-006-00-9	T	28-32	1/2-20/21-22 28-45	
1024	Zinco in polvere (piroforica)		7440-66-6	030-001-00-1	F	15-17	7/8-43	
1025	Zinco in polvere (stabilizzata)			030-002-00-7		10-15	7/8-43	
1026	Ziram			006-012-00-2	Xn	22-38	2-13	
1027	Zirconio in polvere (piroforica)		7740-67-7	040-001-00-3	F	15-17	7/8-43	
1028	Zirconio in polvere (stabilizzata)			040-002-00-9		15	7/8-43	
1029	Zolfo dicloruro		10545-99-0	016-013-00-X	C	14-34-37	26	
1030	Zolfo monocloruro		10025-67-9	016-012-00-4	C	14-34-37	26	
1031	Zolfo tetracloruro		13451-08-6	016-014-00-5	C	14-34-37	26	

ALLEGATO II

METODI DI PROVA

I metodi di prova descritti servono alla determinazione di alcune proprietà tossicologiche ed ecotossicologiche enumerate nell'allegato II del decreto del Presidente della Repubblica 24 novembre 1981, n. 297. Sono descritti i metodi di prova adatti al livello 1 e al livello 2 di tale allegato, ma le prove non sono suddivise in funzione dei diversi livelli.

PARTE B: METODI PER LA DETERMINAZIONE DELLA TOSSICITÀ

INTRODUZIONE GENERALE: PARTE B

STUDI A LUNGO TERMINE

Studi cronici, subcronici e di cancerogenesi

Caratterizzazione della sostanza in esame e della miscela usata per il trattamento

La composizione della sostanza in esame, incluse le impurezze principali e le proprietà fisico-chimiche pertinenti, compresa la stabilità, dovrebbe essere nota prima dell'inizio di qualsiasi studio di tossicità.

Le proprietà fisico-chimiche della sostanza in esame forniscono informazioni importanti per la scelta della via di somministrazione, la progettazione degli studi subcronici, cronici e di cancerogenesi e del trattamento, e della conservazione della sostanza in esame.

Le informazioni sulla struttura chimica e le proprietà fisico-chimiche possono anche fornire indicazioni sulle caratteristiche di assorbimento attraverso la via di somministrazione prevista e le possibilità metaboliche e di distribuzione nel tessuto. Potrebbero esservi anche informazioni sui parametri tossicocinetici provenienti da studi di tossicità e di tossicocinetica precedenti.

L'elaborazione di un metodo analitico per la determinazione qualitativa e quantitativa della sostanza in esame (impurità di maggiore importanza comprese quando possibile) nel mezzo di dosaggio e nel materiale biologico dovrebbe precedere l'inizio dello studio.

Animali da laboratorio: scelta delle specie e del ceppo

Poiché è necessario che il trattamento degli animali si estenda per buona parte della loro durata di vita, gli studi tendono a limitarsi a specie sperimentali a vita relativamente breve e di facile mantenimento. È molto desiderabile conoscere l'incidenza delle patologie spontanee e dei tumori sul ceppo degli animali usati quando essi siano mantenuti in condizioni analoghe.

I ceppi dovrebbero essere ben caratterizzati ed esenti da difetti congeniti interferenti. L'uso di ceppi ottenuti con accoppiamento tra consanguinei o di ibridi di tipo F 1 presenta alcuni vantaggi sotto questo punto di vista; ma ove siano disponibili sufficienti dati di base su ceppi esogami, usando animali di colonie chiuse, questi ultimi sono accettabili.

Cura degli animali, dieta e rifornimento d'acqua

I saggi e gli studi con animali verranno condotti conformemente ai regolamenti nazionali e dovranno tener conto dei principi umanitari e degli sviluppi internazionali nel settore del benessere degli animali.

Per ottenere risultati significativi sono necessari un controllo rigoroso delle condizioni ambientali e delle tecniche adeguate di cura degli animali. Fattori quali le condizioni di alloggiamento, le malattie intercorrenti, le terapie con farmaci, le impurezze nella dieta, l'aria, l'acqua, le lettiere e gli impianti per la cura degli animali in genere possono influire significativamente sul risultato degli studi con dosi ripetute. In generale, gli effetti degli sterilizzanti chimici sullo studio dovrebbero essere noti.

La dieta dovrebbe rispondere a tutte le esigenze nutrizionali della specie saggiata e dovrebbe essere esente dalle impurità che potrebbero influenzare il risultato della prova. I roditori dovrebbero essere nutriti e abbeverati ad libitum con alimenti sostituiti almeno ogni settimana. Attualmente vengono utilizzati tre tipi di diete: convenzionale; sintetica e varie diete a formula aperta.

Qualunque sia la dieta scelta, i fornitori devono accertare con controlli periodici il valore nutritivo e il livello di contaminanti nella dieta base, e fornire queste informazioni al laboratorio con ciascun lotto di mangime. È altamente desiderabile conoscere gli effetti del regime dietetico sul metabolismo come pure lo sviluppo dei tumori e la longevità degli animali.

Inoltre, le analisi di controllo della dieta base possono essere effettuate dal laboratorio che esegue le prove, sia per i componenti alimentari, sia per i contaminanti involontari, compresi i carcinogeni. In tal caso i risultati delle analisi dovrebbero essere tenuti e inclusi nella relazione finale su ciascuna sostanza in esame.

I costituenti dietetici comuni che sono noti per influenzare la carcinogenesi (es.: antiossidanti, acidi grassi insaturi, selenio) non dovrebbero essere presenti in concentrazioni interferenti. L'impatto potenziale di diversi contaminanti dietetici comuni sulla valutazione della cancerogenicità implica che particolare attenzione sia dedicata alla presenza, nella dieta, di residui di antiparassitari, di componenti organo-clorurati, di idrocarburi policiclici aromatici, di estrogeni, di metalli pesanti, di nitrosammine e micotossine.

Quando la sostanza sperimentale viene somministrata nell'acqua o negli alimenti, le prove di stabilità sono essenziali. Prove di omogeneità e di stabilità effettuate correttamente prima degli studi con dosi ripetute dovrebbero essere usate per stabilire la frequenza richiesta della preparazione della dieta e dei controlli.

Quando le diete sono sterilizzate, gli effetti di tali procedimenti sulla sostanza in esame e sui costituenti dietetici dovrebbero essere noti. Si dovrebbero apportare le opportune rettifiche.

Durante le prove di cancerogenesi, i ricercatori dovrebbero essere consapevoli dei contaminanti potenziali dell'acqua usata. *L'acqua approvata per il consumo umano è generalmente soddisfacente* e si dovrebbe disporre di informazioni sulla sua composizione.

Vi può essere la necessità di variare la concentrazione di una sostanza in esame nella dieta con la crescita degli animali allo scopo di mantenere una ingestione ragionevolmente costante della sostanza in esame in relazione al peso corporeo degli animali.

Il valore nutritivo della dieta di controllo e di quella in esame dovrebbe essere il più simile possibile. Di conseguenza, il valore nutritivo di una sostanza in esame mescolata nella dieta necessita di essere preso in considerazione. L'esperienza suggerisce che fino ad un massimo di 5 % di sostanze in esame non nutritive nella dieta, interferenze significative con il valore nutritivo della dieta sono improbabili.

1. Studi inalatori

Non viene precisata nessuna prova limite perché non è stato possibile definire un valore limite unico di esposizione per inalazione.

2. Studio di teratogenesi

Il metodo di prova è orientato principalmente verso la somministrazione per via orale.

Alternativamente, altre vie possono essere utilizzate a seconda delle proprietà fisiche della sostanza in esame e della via probabile dell'esposizione umana. In tali casi, il metodo di saggio dovrà essere opportunamente adottato prendendo in considerazione gli elementi appropriati del metodo di saggio a 28 giorni.

3. Tossicocinetica

Gli studi tossicocinetici sono d'aiuto nell'interpretazione e nella valutazione dei dati di tossicità. Essi hanno segnatamente lo scopo di chiarire aspetti particolari della tossicità della sostanza chimica in esame, e i risultati possono aiutare nella programmazione di ulteriori studi di tossicità. Non si considera che sia necessario determinare la totalità dei parametri in ciascun caso. La sequenza completa degli studi tossicocinetici (assorbimento, escrezione, distribuzione e metabolismo) sarà necessaria soltanto in rari casi. Per taluni composti potrebbero essere opportune modifiche di detta sequenza, ovvero potrebbe essere sufficiente uno studio con dose unica.

Definizioni

tossicocinetica: studio dell'assorbimento, della distribuzione, del metabolismo e dell'escrezione delle sostanze in esame.

assorbimento: processo o l'insieme di processi per i quali una sostanza somministrata viene assorbita dall'organismo.

escrezione: processo o l'insieme di processi per i quali la sostanza somministrata e/o i suoi metaboliti vengono eliminati dall'organismo.

distribuzione: processo o l'insieme di processi per i quali la sostanza assorbita e/o i suoi metaboliti si ripartiscono nell'organismo.

metabolismo: processo(i) per il quale la sostanza somministrata viene strutturalmente modificata nell'organismo mediante reazioni enzimatiche e non enzimatiche.

4. Studio acuto e subacuto su una seconda specie

Gli studi su una seconda specie hanno lo scopo di fornire complemento alle conclusioni tratte dagli studi sulla prima specie.

Negli eventuali studi su una seconda specie il metodo di saggio già descritto può essere usato oppure adattato per usare un numero minore di animali.

5. Studi sulla fertilità

Nei casi per i quali occore un saggio sulla riproduzione in tre generazioni, si può estendere il metodo descritto per il saggio di riproduzione su due generazioni in modo che esso comprende una terza generazione.

6. Studi sulla mutagenesi

Prove supplementari delle mutagenesi incluso prove di screening delle cancerogenesi

Introduzione

La prima valutazione dell'attività mutagena di una sostanza consiste nella ricerca di mutazioni geniche (puntiformi) nei batteri e del danno cromosomico nelle cellule dei mammiferi (in vitro o in vivo); in precendenza sono stati descritti i metodi appropriati per questa serie di prove di base. Questo capitolo riguarda l'ulteriore ricerca necessaria per la verifica e/o l'ampliamento dei risultati ottenuti durante la serie di prove di base, che può essere utilizzata per un certo numero di scopi:

1) per confermare i risultati della serie di prove di base;

2) per ricercare eventi genetici non studiati durante la serie di prove di base;

3) per iniziare o ampliare la ricerca in vivo.

Al tal uopo, la gamma delle prove descritte comprende sistemi eucariotici sia in vitro sia in vivo e una vasta serie di eventi genetici. Le prove forniscono informazioni sulle mutazioni puntuali negli organismi più complessi dei batteri utilizzati nella serie di prove di base e ampliano le informazioni sulla capacità di una sostanza di causare aberrazioni cromosomiche.

Vengono descritte anche le prove per eventi genetici diversi dalle mutazioni puntiformi e dalle aberrazioni cromosomiche, queste prove forniscono ulteriori informazioni e possono essere appropriatamente utilizzate negli schemi d'analisi.

In generale, allorquando si redige un programma di ulteriore ricerca sulla mutagenicità, dovrebbero essere fornite le relative informazioni addizionali sul potenziale mutageno e/o cancerogeno di quella sostanza.

Gli studi che potrebbero risultare adatti ad un caso specifico dipendono da numerosi fattori, comprendenti le caratteristiche chimiche e fisiche della sostanza, i risultati delle prove batteriologiche e citogenetiche iniziali, il profilo metabolico della sostanza, i risul[illegible] di altre ricerche tossicologiche e l'impiego conosciuto della sostanza. A causa dei numerosi fattori da prendere i[illegible]nsiderazione, risulta inappropriato uno schema rigido per la selezione delle prove. Tuttavia, possono essere for[illegible] alcuni principi generali. Quando una prova risulta positiva nel corso della ricerca di base, l'ulteriore ricerca deve comprendere almeno una prova in grado di rivelare lo stesso evento genetico. Quando entrambe le prove della ricerca di base risultano negative, l'ulteriore ricerca deve di norma comprendere una prova per le mutazioni geniche ed una per le aberrazioni cromosomiche. Sarà inoltre opportuno ottenere ulteriori dati da prove indicatrici di effetti su DNA (elencate qui di seguito). I metodi da seguire per questa ricerca vengono elencati qui di seguito in funzione della loro risultante genetica principale.

Studio delle mutazioni geniche (puntiformi)

Per ricercare ulteriormente la capacità di una sostanza di causare mutazioni geniche (puntiformi), può risultare adeguata una delle prove seguenti:

a) ricerca di mutazioni in avanti o di ritorno utilizzando microorganismi eucariotici (Saccharomyces cerevisiae);

b) prove in vitro per la ricerca di mutazioni in avanti in cellule di mammifero;

c) prova dei letali recessivi legati al sesso in Drosophila melanogaster;

d) prova in vivo di mutazioni in cellule somatiche: prova delle macchie (spot test) nel topo.

Ricerca delle aberrazioni cromosomiche

Quando è necessario approfondire la capacità di una sostanza a causare aberrazioni cromosomiche, può essere effettuata una delle seguenti prove:

a) studi citogenetici in vivo nel mammifero.

Si dovrà includere l'analisi della metafase in vivo delle cellule del midollo osseo nel caso in cui non sia stata inclusa nella valutazione iniziale (serie di prove di base). Si potrà inoltre effettuare il saggio citogenetico in vivo in cellule germinali;

b) studio citogenetico in vitro in cellule di mammifero, se non è stato effettuato nel corso della valutazione iniziale;

c) studio dei letali dominanti in roditori;

d) prova delle traslocazioni ereditarie nel topo.

Prove con indicatori per gli effetti sul DNA

Esistono metodi per la rilevazione di alcuni effetti sul DNA, ma che non hanno conseguenze mutagene come «evento finale». Questi studi possono fornire informazioni complementari a quelle ottenute dagli studi sulla mutagenicità, che possono risultare utili per l'interpretazione di tali studi. In caso di necessità può risultare utile seguire uno dei metodi seguenti, utilizzando microrganismi eucariotici o cellule di mammiferi:

a) ricombinazione mitotica in Saccharomyces cerevisiae;

b) danno e riparazione del DNA — sintesi del DNA non programmata — in cellule di mammifero (in vitro);

c) scambi di cromatidi fratelli in cellule di mammifero (in vitro).

Altre prove con indicatore per la ricerca del potenziale cancerogeno

Esistono prove per la ricerca della trasformazione in vitro delle cellule dei mammiferi che misurano la capacità di una sostanza di causare cambiamenti morfologici e comportamentali in una coltura di cellule. Si ritiene che ciò sia connesso con la trasformazione maligna in vivo. Per la trasformazione si può usare un certo numero di tipi diversi di cellule e seguire criteri diversi.

Valutazione del rischio degli effetti ereditabili nei mammiferi

Esistono metodi per misurare in mammiferi gli effetti ereditabili, causati da mutazioni geniche (puntiformi), come la prova dei loci specifici nel topo (1), oppure per determinare le aberrazioni cromosomiche, come la prova di traslocazioni ereditarie nel topo.

Tali metodi possono essere eseguiti per la valutazione del possibile rischio genetico di una sostanza per l'uomo. Tuttavia, a causa della complessità di queste prove e dell'elevato numero di animali necessari, in particolare per la prova dei loci specifici, occorre un'ottima giustificazione per intraprendere queste prove.

(1) La prova dei loci specifici nel topo (non descritta in questo documento) può essere utilizzata per misurare induzione di mutazioni geniche in cellule germinali nella prima generazione, dopo l'esposizione ad una sostanza mutagena. Possono essere rilevate e quantificate le alterazioni genetiche che portano a cambiamenti nei prodotti genici che causano fenotipi visibili.

SAGGIO DI TOSSICITÀ ORALE SUBCRONICA

SAGGIO CON SOMMINISTRAZIONE ORALE RIPETUTA DI DOSI PER 90 GIORNI USANDO SPECIE DI RODITORI

1. METODO

1.1. **Introduzione**

Vedi introduzione generale, parte B.

1.2. **Definizioni**

Vedi introduzione generale, parte B.

1.3 **Sostanze di riferimento**

Nessuna.

1.4. **Principi del metodo di saggio**

La sostanza sperimentale viene somministrata giornalmente, per via orale, in dosi scalari a vari gruppi di animali da laboratorio, una dose per gruppo e per un periodo di 90 giorni. Durante il periodo di somministrazione, gli animali vengono giornalmente sottoposti ad osservazione per individuare segni di tossicità. Gli animali che muoiono durante la prova vengono sottoposti a necroscopia; alla conclusione del saggio anche gli animali superstiti vengono sottoposti a necroscopia.

1.5. **Criteri qualitativi**

Nessuno.

1.6. **Descrizione del metodo di saggio**

Preparazioni

Gli animali sono tenuti nelle condizioni sperimentali di alloggiamento e nutrizione sperimentali per almeno 5 giorni prima dell'inizio del saggio. Prima dell'esperimento, gli animali giovani e sani vengono mischiati con metodo casuale ed assegnati ai gruppi di trattamento e di controllo.

La sostanza in esame può essere somministrata nella dieta, con sonda, in capsule o in acqua potabile. Il dosaggio per tutti gli animali dovrebbe essere fatto con lo stesso metodo durante l'intero periodo dell'esperimento. Se un veicolo od altri additivi sono utilizzati per facilitare il dosaggio, essi non dovrebbero notoriamente produrre effetti tossici. Se del caso, si possono utilizzare i dati storici.

Condizioni sperimentali

Animali da esperimento

A meno che non vi siano controindicazioni, la specie preferita è il ratto. Si dovrebbero usare ceppi comunemente usati in laboratorio di giovani animali sani ed il dosaggio dovrebbe iniziare idealmente prima che i ratti abbiano raggiunto le sei settimane di età (comunque non più di 8 settimane). All'inizio dello studio, la variazione di peso degli animali usati non dovrebbe superare il ± 20 % del valore medio. Quando uno studio subcronico orale venga intrapreso come preliminare ad uno studio a lungo termine, si dovrebbe usare la stessa specie e lo stesso ceppo in entrambi gli studi.

Numero e sesso

Per ciascun livello di dose si dovrebbero utilizzare almeno 20 animali (10 maschi e 10 femmine). Le femmine dovrebbero essere nullipare e non gravide. Qualora si preveda di sacrificare ad intervalli alcuni animali, il numero dovrebbe essere aumentato del numero di animali che si prevede di sacrificare prima del completamento dello studio. Inoltre, un gruppo satellite di 20 animali (10 animali per sesso) può essere trattato con livelli di dose elevati per 90 giorni e sottoposto ad osservazione per l'individuazione della reversibilità, della persistenza o dell'insorgenza ritardata di effetti tossici per 28 giorni dopo il trattamento.

Livelli di dose

Si dovrebbero usare almeno tre livelli di dose e un controllo. Eccezion fatta per il trattamento con la sostanza in esame, gli animali del gruppo di controllo dovrebbero essere tenuti in modo identico a quelli del gruppo trattato. Quando si utilizza un veicolo per facilitare il dosaggio, ai controlli si dovrebbe somministrare il veicolo, allo stesso modo dei gruppi trattati; gli animali di controllo dovrebbero ricevere la stessa quantità di veicolo di quella ricevuta dal gruppo trattato col livello di dose più elevato. Il livello di dose più elevato dovrebbe provocare effetti tossici ma produrre pochi o nessun decesso. Il livello di dose più basso non dovrebbe produrre effetti tossici. Quando esista una valutazione utile dell'esposizione umana, il livello più basso dovrebbe superare detto valore.

Idealmente, il livello di dose intermedio dovrebbe produrre effetti tossici osservabili minimi. Se viene usata più di una dose intermedia, i livelli di dose dovrebbero essere intervallati per produrre una graduazione degli effetti tossici.

Nei gruppi trattati con livelli di dose bassi e intermedi e nei controlli, l'incidenza degli eventi letali dovrebbe essere bassa e tale da permettere una valutazione significativa dei risultati.

Quando la sostanza in esame viene somministrata nella dieta, si possono utilizzare sia una concentrazione dietetica costante (ppm o mg/kg di alimento) oppure un livello di dose costante in termini di peso corporeo degli animali; l'alternativa usata deve essere specificata. Per una sostanza somministrata con sonda, la dose dovrebbe essere somministrata ogni giorno allo stesso orario. I livelli di dose dovrebbero essere adattati ad intervalli (settimanalmente o ogni due settimane) per mantenere un livello di dose costante in termini di peso corporeo dell'animale.

Saggio limite

Se uno studio di 90 giorni, condotto conformemente al metodo descritto sotto, ad un livello di dose di 1 000 mg/kg di peso corporeo/giorno o ad un livello di dose più elevato in relazione ad una possibile esposizione umana, (quando questa sia nota) non produce evidenze di effetti tossici, ulteriori prove possono essere considerate non necessarie. Per le sostanze a bassa tossicità è importante assicurarsi che, quando somministrate nella dieta, le quantità e le altre proprietà della sostanza in esame di cui trattasi non interferiscano con le esigenze nutrizionali normali.

Periodo di osservazione

Tutti gli animali dovrebbero essere quotidianamente sottoposti ad osservazione e si dovrebbero registrare i segni di tossicità inclusi il tempo di insorgenza, il grado e la durata. Si dovrebbero annotare anche il tempo della morte e quello dell'insorgenza o della scomparsa dei sintomi di tossicità.

Procedimento

Gli animali vengono trattati con la sostanza in esame, idealmente sette giorni per settimana, per un periodo di 90 giorni. Gli animali appartenenti ad ogni gruppo satellite previsto per ulteriori osservazioni dovrebbero essere tenuti ancora 28 giorni senza trattamento per individuare la guarigione oppure la persistenza degli effetti tossici.

Le osservazioni cliniche includeranno i cambiamenti della cute e del pelo, degli occhi e delle mucose nonché del sistema nervoso centrale e periferico, di quello respiratorio, circolatorio, dell'attività somatomotoria e del quadro comportamentale. Si dovrebbe procedere settimanalmente alla misurazione del consumo alimentare (e del consumo dell'acqua quando la sostanza in esame sia somministrata in tale veicolo) ed al peso degli animali.

Un'osservazione regolare degli animali è necessaria onde evitare per quanto possibile perdite di animali dallo studio dovute a cause come cannibalismo, autolisi dei tessuti o errata collocazione. Alla fine del periodo di esposizione tutti gli animali sopravvissuti saranno sottoposti ad autopsia; gli animali moribondi dovranno essere rimossi e sottoposti ad autopsia.

I seguenti esami vengono effettuati abitualmente per tutti gli animali, compresi i controlli:

a) l'esame oftalmoscopico, eseguito con un oftalmoscopio o attrezzatura analoga idonea, dovrebbe essere effettuato prima della somministrazione della sostanza in esame e della conclusione dello studio, preferibilmente su tutti gli animali o perlomeno su quelli a cui viene somministrato il dosaggio elevato e al gruppo di controllo. Se vengono individuati cambiamenti agli occhi, tutti gli animali dovrebbero essere esaminati;

b) alla fine del periodo di saggio, si dovrebbero effettuare le seguenti analisi: ematologia, inclusi ematocrito, concentrazione di emoglobina, conteggio degli eritrociti, conteggio totale e differenziale dei leucociti, una misurazione del potenziale di coagulazione, quali il tempo di coagulazione, il tempo di protrombina, il tempo di tromboplastina o il conteggio delle piastrine;

c) la determinazione di biochimica clinica sul sangue dovrebbe essere effettuata alla fine del periodo di saggio. Le aree di saggio, ritenute opportune per tutti gli studi sono: equilibrio degli elettroliti, metabolismo dei carboidrati, funzione epatica e renale. La selezione delle prove specifiche sarà determinata dalle osservazioni

sul modo di azione della sostanza. Si suggeriscono le seguenti determinazioni: calcio, fosforo, cloruro, sodio, potassio, glucosio a digiuno (con un periodo di digiuno appropriato alla specie), glutamminico-piruvica transaminasi serica [1] glutammico-ossalacetico transaminasi serica [2], ornitina decarbossilasi, gamma glutammil transpeptidase, azoto ureico, albumina, creatinina nel sangue, bilirubina totale e misurazione delle proteine totali del siero. Altre determinazioni che possono rendersi necessarie per una valutazione tossicologica adeguata, includono: analisi dei lipidi, ormoni, equilibrio acido/base, metaemoglobina, attività della colinesterasi. Determinazioni biochimiche supplementari possono essere usate, se del caso, per estendere la ricerca sugli effetti osservati;

d) l'analisi delle urine non è richiesta routinariamente, ma solo quando vi siano indicazioni basate sulla tossicità prevista o osservata;

Se i dati storici di base sono insufficienti, prima di iniziare il dosaggio si dovrebbe prendere in considerazione la determinazione dei parametri di biochimica clinica.

Necroscopia macroscopica

Tutti gli animali dovrebbero essere sottoposti a completa necroscopia macroscopica che include l'esame della superficie esterna del corpo, di tutti gli orifizi e delle cavità craniche, toraciche e addominali e dei loro contenuti. Il fegato, i reni, le ghiandole surrenali e i testicoli dovrebbero essere pesati umidi, appena possibile dopo la dissezione, per evitare l'essiccamento. I seguenti organi e tessuti dovrebbero essere conservati in mezzo adatto per esami istopatologici futuri possibili: tutte le lesioni macroscopiche, cervello — comprese sezioni di midollo spinale/ponte, corteccia cerebellare e corteccia cerebrale, pituitaria, tiroide/paratiroide, qualsiasi tessuto timico, trachea e polmoni, cuore, aorta, (ghiandole salivarie), milza, fegato, reni, ghiandole surrenali, pancreas, gonadi, utero, (organi genitali accessori), (pelle), esofago, stomaco, duodeno, digiuno, ileo, intestino cieco, colon, retto, vescica urinaria, linfonodi rappresentativi, (ghiandole mammarie femminili), (muscolatura della coscia), nervo periferico, sterno con midollo osseo, (occhi), (femore — compresa superficie articolare), (midollo spinale a tre livelli — cervicale, mediotoracico e lombare), e (ghiandole lacrimali esorbitali).

(I tessuti citati tra parentesi devono essere esaminati solo se presentano sintomi di tossicità o se vi siano indicazioni che sono l'organo-bersaglio coinvolto).

Esame istopatologico

a) L'esame istopatologico completo dovrebbe essere effettuato sugli organi e sui tessuti degli animali nei gruppi trattati col dosaggio più elevato e nel gruppo di controllo;

b) tutte le lesioni macroscopiche dovrebbero essere esaminate;

c) esame degli organi-bersaglio in altri gruppi trattati con altre dosi;

d) i polmoni degli animali nei gruppi trattati con dosaggi bassi ed intermedi dovrebbero essere sottoposti ad esame istopatologico per l'individuazione di infezioni, poiché ciò fornisce una valutazione appropriata dello stato di salute degli animali. Particolare attenzione dovrebbe inoltre essere dedicata in questi gruppi all'esame istopatologico del fegato e dei reni. Ulteriori esami istopatologici di routine possono non essere richiesti per gli animali di detti gruppi, ma devono sempre essere effettuati sugli organi che presentano lesioni, nel gruppo trattato con la dose elevata;

e) quando si fa uso di un gruppo satellite, si dovrebbe eseguire l'esame istopatologico dei tessuti e degli organi che presentano lesioni nei gruppi trattati.

2. DATI

I dati dovrebbero essere riassunti sotto forma di tabelle, indicando per ogni gruppo di saggio il numero di animali all'inizio della prova, il numero degli animali che presentano lesioni e la percentuale degli animali che presenta ciascun tipo di lesioni. I risultati dovrebbero essere valutati con un metodo statistico idoneo. Qualsiasi metodo statistico riconosciuto può essere utilizzato.

3. RELAZIONE

3.1. Relazione sul saggio

Nella relazione sul saggio devono figurare, se possibile:

— specie, ceppo, origine, condizioni ambientali, dieta,

— condizione sperimentali,

— livelli di dose (veicolo compreso, se utilizzato) e concentrazioni,

— dati sulla risposta tossica per sesso e per dose,

---

(1) Ora nota come alanina aminotransferasi serica.

(2) Ora nota come aspartato aminotransferasi serica.

— livello senza effetto, quando possibile,
— tempo della morte durante l'esperimento oppure specificare se gli animali erano sopravvissuti alla conclusione della prova,
— descrizione degli effetti tossici o di altri effetti,
— tempo di osservazione di ogni segno anomalo e successivo decorso,
— alimentazione e dati sul peso corporeo,
— risultati oftalmologici,
— analisi ematologiche usate e risultati completi,
— analisi di biochimica clinica usati e risultati completi (compresi i risultati di ogni analisi delle urine),
— risultati nella necroscopia,
— descrizione particolareggiata di tutti i risultati istopatologici,
— elaborazione statistica dei risultati, quando possibile,
— discussione dei risultati,
— interpretazione dei risultati.

3.2. **Valutazione ed interpretazione**

Vedi introduzione generale, parte B.

RIFERIMENTI

Vedi introduzione generale, parte B.

SAGGIO DI TOSSICITÀ ORALE SUBCRONICA

SAGGIO CON SOMMINISTRAZIONE ORALE RIPETUTA DI DOSI PER 90 GIORNI USANDO SPECIE DI NON RODITORI

1. METODO

1.1. **Introduzione**

Vedi introduzione generale, parte B.

1.2. **Definizioni**

Vedi introduzione generale, parte B.

1.3. **Sostanze di riferimento**

Nessuna.

1.4. **Principi del metodo di saggio**

La sostanza sperimentale viene somministrata ogni giorno, oralmente in dosi graduate, a diversi gruppi di animali da esperimento (non roditori), una dose per gruppo, per un periodo di 90 giorni. Durante il periodo di somministrazione, gli animali sono sottoposti giornalmente ad osservazione per individuare i segni di tossicità. Gli animali che muoiono durante la prova sono sottoposti a necroscopia; alla conclusione dell'esperimento anche gli animali superstiti vengono sottoposti a necroscopia.

1.5. **Criteri qualitativi**

Nessuno.

1.6. **Descrizione del metodo di saggio**

Preparazioni

Gli animali sono tenuti nelle condizioni di alloggiamento e di alimentazione per almeno cinque giorni prima del saggio. Prima della prova gli animali giovani e sani sono mischiati con metodo casuale ed assegnati ai gruppi di trattamento e a quello di controllo.

La sostanza in esame può essere somministrata nella dieta oppure la somministrazione in capsule può essere ritenuta più comoda. Altri mezzi di somministrazione orale possono essere utilizzati. Durante l'intero periodo sperimentale, il dosaggio agli animali dovrà essere fatto con lo stesso metodo. Se per facilitare il dosaggio si utilizzano un veicolo o altri additivi, essi dovrebbero essere noti per non produrre effetti tossici. Se del caso, si possono utilizzare i dati storici.

Condizioni sperimentali

Animali da esperimento

La specie di non-roditori generalmente utilizzata è il cane, di razza preferibilmente definita. Altre specie di non-roditori possono essere utilizzate. Si dovrebbe usare esemplari giovani e sani, e, nel caso del cane, il dosaggio dovrebbe iniziare preferibilmente a 4-6 mesi e non più tardi di 9 mesi di età. Quando venga intrapreso uno studio di tossicità subcronica orale come preliminare ad uno studio a lungo termine, si dovrebbe usare la stessa specie e lo stesso ceppo in entrambi gli studi.

Numero e sesso

Per ciascun livello di dose si dovrebbero usare almeno 8 animali (4 maschi e 4 femmine). Alla conclusione dello studio, il numero di animali deve essere tale da garantire una valutazione significativa degli effetti tossici.

Livelli di dose

Si dovrebbero usare almeno tre livelli di dose e un controllo. Eccezion fatta per il trattamento con la sostanza in esame, gli animali nel gruppo di controllo dovrebbero essere trattati in modo identico ai soggetti dei gruppi trattati. Il livello di dose più elevato dovrebbe provocare effetti tossici ma non produrre decessi.

Il livello di dose più basso non dovrebbe produrre alcuna evidenza di effetti tossici. Quando esiste una valutazione utile della esposizione umana, il livello di dose più basso dovrebbe superare detto valore. Idealmente, il livello di dose medio dovrebbe produrre effetti tossici osservabili minimi. Se viene usata più di una dose intermedia, i livelli di dose dovrebbero essere intervallati per produrre una graduazione degli effetti tossici.

Nei gruppi a dosaggio basso ed intermedio e nei controlli non si dovrebbero verificare decessi.

Per sostanze a bassa tossicità è importante assicurarsi che, una volta somministrata nella dieta, le quantità della sostanza in esame non interferiscano con la nutrizione normale.

Quando la sostanza in esame viene somministrata nella dieta, si possono utilizzare sia una concentrazione dietetica costante (ppm o mg/kg di alimento) oppure un livello di dose costante in termini di peso corporeo degli animali; l'alternativa usata deve essere specificata. Quando somministrata direttamente, per esempio in capsule, la dose deve essere somministrata ogni giorno allo stesso orario ed adattata a seconda della necessità a intervalli settimanali per mantenere un livello di dose costante i termini di peso corporeo degli animali. Quando uno studio subcronico viene usato come premessa ad uno studio a lungo termine, in entrambi gli studi si dovrà usare una dieta analoga.

Se uno studio di 90 giorni, condotto conformemente al metodo descritto sotto, ad un livello di dose di 1 000 mg/kg di peso corporeo/giorno o ad un livello di dose più elevato in relazione ad una possibile esposizione umana quando questa sia nota, non produce evidenze di effetti tossici, ulteriori prove possono essere considerate non necessarie. Per le sostanze a bassa tossicità è importante assicurarsi che, quando somministrate nella dieta, le quantità e le altre proprietà della sostanza in esame di cui trattasi non interferiscano con le esigenze nutrizionali normali.

Periodo di osservazione

Tutti gli animali dovrebbero essere osservati giornalmente e si dovrebbero registrare eventuali segni di tossicità, incluso il tempo di insorgenza, il grado e la durata. Si dovranno annotare anche il tempo della morte e quello dell'insorgenza o della scomparsa dei segni di tossicità.

Procedimento

Gli animali vengono trattati con la sostanza in esame, idealmente sette giorni per settimana, per un periodo di 90 giorni. Tuttavia, sulla base principalmente di considerazioni pratiche, quando la sostanza vienne somministrata con modalità diverse da quella dell'aggiunta nella dieta, viene considerato accettabile che il dosaggio sia effettuato 5 giorni per settimana.

Le osservazioni dovrebbero includere, ma non essere limitate ai cambiamenti della cute e del pelo, degli occhi e delle mucose nonché del sistema nervoso centrale ed autonomo, di quello respiratorio e circolatorio, dell'attività somatomotoria e del quadro comportamentale. Si dovrebbe procedere settimanalmente alla misura del consumo alimentare (e del consumo dell'acqua quando la sostanza in esame è somministrata in tale veicolo) e alla pesatura degli animali.

Un accurato esame clinico degli animali dovrebbe essere eseguito quotidianamente con misure appropriate per minimizzare la perdita di animali del saggio. Alla fine del periodo di esposizione tutti gli animali sopravvissuti sono sottoposti a necroscopia. Gli animali moribondi dovrebbero essere rimossi e sottoposti a necroscopia quando notati.

I seguenti esami vengono effettuati abitualmente per tutti gli animali, compresi i controlli:

a) l'esame oftalmoscopico, eseguito con un oftalmoscopio o idonea attrezzatura analoga, dovrebbe essere effettuato prima della somministrazione della sostanza in esame e alla conclusione dello studio, preferibilmente su tutti gli animali, o perlomeno su quelli trattati con il dosaggio più elevato e nel gruppo di controllo. Se vengono individuati cambiamenti agli occhi, tutti gli animali dovranno essere esaminati;

b) all'inizio del saggio e, quindi, sia ad intervalli mensili o alla metà del periodo di saggio ed, infine, alla fine del saggio si dovrebbero effettuare le seguenti analisi: ematologia, incluso l'ematocrito, concentrazione di emoglobina, conteggio degli eritrociti, conteggio totale e differenziale dei leucociti, misura del potenziale coagulante, quali il tempo di coagulazione, il tempo di protrombina, il tempo di tromboplastina o conteggio delle piastrine;

c) la determinazione della biochimica clinica sul sangue dovrebbe essere effettuata all'inizio del saggio e, quindi, sia ad intervalli mensili o alla metà del periodo di saggio ed, infine, alle fine del saggio. Gli aspetti di saggio ritenuti opportuni per tutti gli studi sono: equilibrio degli elettroliti, metabolismo dei carboidrati, funzione epatica e renale. La selezione delle prove specifiche sarà determinata dalle osservazioni sul modo di azione della sostanza. Si suggerisce di determinare: calcio, fosforo, cloruro, sodio, potassio, glucosio a digiuno (con periodo di digiuno appropriato alla specie/ceppo), glutamminico-piruvica transaminasi serica [1], glutammico-ossalacetico transaminasi serica [2], ornitina decarbossilasi, gamma glutammil transpeptidase, azoto

[1] Ora nota come alanina aminotransferasi serica.
[2] Ora nota come aspartato aminotransferasi serica.

ureico, albumina, creatinina nel sangue, bilirubina totale e misura delle proteine totali del siero. Altre determinazioni che possono rendersi necessarie per una valutazione tossicologica adeguata, includono: analisi dei lipidi, ormoni, equilibrio acido/base, metaemoglobina, attività della colinesterasi. Determinazioni biochimiche supplementari possono essere usate, se del caso, per estendere la ricerca sugli effetti osservati. I non-roditori dovrebbero essere tenuti a digiuno per un periodo di tempo (non più di 24 ore) prima di prelevare i campioni di sangue;

d) l'analisi delle urine non è richiesta routinariamente, ma solo quando vi sia una indicazione basata sulla tossicità prevista o osservata.

Necroscopia macroscopica

Tutti gli animali dovrebbero essere sottoposti a necroscopia macroscopica completa, che include l'esame della superficie esterna del corpo, di tutti gli orifizi e delle cavità cranica, toracica e addominale e dei loro contenuti. Il fegato, i reni, le ghiandole surrenali, la tiroide (e le paratiroidi) e i testicoli dovrebbero essere pesati umidi, appena possibile dopo la dissezione, per evitare l'essiccamento. I seguenti organi e tessuti dovrebbero essere conservati in un mezzo adatto per futuri possibili esami istopatologici: tutte le lesioni generali; cervello — comprese sezioni di midollo/ponte, corteccia cerebellare e corteccia cerebrale, pituitaria, tiroide/paratiroide, qualsiasi tessuto timico, (trachea) polmoni, cuore, aorta, ghiandole salivari, milza, fegato, reni, ghiandole surrenali, pancreas, gonadi, utero, organi genitali accessori), (pelle), cistifellea, esofago, stomaco, duodeno, digiuno, ileo, intestino cieco, colon, retto, vescica, urinaria, linfonodi rappresentativi, (ghiandole mammarie femminili), (muscolatura della coscia), nervo periferico (occhi), sterno con midollo osseo, (femore — compresa superficie articolare) e (midolo spinale a tre livelli — cervicale; emitoracico e lombare). (I tessuti citati tra parentesi devono essere esaminati solo se presentano sintomi di tossicità o se vi siano indicazioni che sono l'organo-bersaglio coinvolto).

Esame istopatologico

Dovrebbe essere effettuato l'esame istopatologico completo degli organi e dei tessuti degli animali del gruppo trattato con la dose elevata e del gruppo di controllo. Un ulteriore esame istopatologico dovrebbe essere effettuato in gruppi trattati con altre dosi sugli organi che presentano lesioni nel gruppo trattato con la dose elevata o per le quali le osservazioni cliniche indichino tale esigenza.

DATI

I dati dovrebbero essere riassunti sotto forma di tabelle, indicando per ogni gruppo sperimentale il numero di animali all'inizio della prova, il numero degli animali che presentano lesioni, i tipi di lesione e la percentuale degli animali che presenta ciascun tipo di lesioni. I risultati dovrebbero essere valutati con un metodo statistico idoneo. Qualsiasi metodo statistico riconosciuto può essere utilizzato.

RELAZIONE

Relazione sul saggio

Nella relazione sul saggio devono figurare, se possibile:

— specie, ceppo, origine, condizioni ambientali, dieta, ecc.,

— condizione sperimentali,

— livelli di dose veicolo compreso, se utilizzato e concentrazioni,

— risposta tossica per sesso e per dose,

— livello senza effetto, quando possibile,

— tempo della morte durante lo studio, oppure specificare se gli animali sono sopravvissuti fino alla conclusione del saggio,

— descrizione degli effetti tossici o di altri effetti con particolare attenzione ai risultati clinici),

— tempo di osservazione di ogni segno anomalo e successivo decorso,

— dati di alimentazione sul peso corporeo,

— risultati oftalmologici,

— analisi ematologiche usate e risultati completi,
— analisi di biochimica clinica usate e risultati completi (compresi i risultati di qualsiasi analisi delle urine),
— risultati della necroscopia,
— una descrizione particolareggiata di tutti i risultati istopatologici,
— elaborazione statistica dei risultati, quando appropriata,
— discussione dei risultati,
— interpretazione dei risultati.

3.2. Valutazione ed interpretazione

Vedi introduzione generale, parte B.

4. RIFERIMENTI

Vedi introduzione generale, parte B.

SAGGIO DI TOSSICITÀ CUTANEA SUBCRONICA

SAGGIO CON SOMMINISTRAZIONE CUTANEA RIPETUTA DI DOSI PER 90 GIORNI USANDO SPECIE DI RODITORI

1. METODO

1.1. Introduzione

Vedi introduzione generale, parte B.

1.2. Definizioni

Vedi introduzione generale, parte B.

1.3. Sostanze di riferimento

Nessuna.

1.4. Principi del metodo di saggio

La sostanza sperimentale viene applicata quotidianamente alle cute in dosi scalari a vari gruppi di animali da esperimento, una dose per gruppo per un periodo di 90 giorni. Durante il periodo di somministrazione, gli animali vengono giornalmente sottoposti ad osservazione per individuare segni di tossicità. Gli animali che muoiono durante il saggio vengono sottoposti a necroscopia, ed alla conclusione della prova anche gli animali superstiti vengono sottoposti a necroscopia.

1.5. Criteri qualitativi

Nessuno.

1.6. Descrizione del metodo di saggio

Preparazioni

Gli animali sono tenuti nelle condizioni sperimentali di alloggiamento ed alimentazione per almeno 5 giorni prima dell'inizio del saggio. Prima dell'esperimento, gli animali giovani e sani vengono mischiati con metodo casuale ed assegnati ai gruppi di trattamento e di controllo. Poco prima dell'inizio dell'esperimento gli animali da trattare vengono tosati nella zona dorsale del tronco. Si può usare la rasatura, ma questa dovrebbe essere effettuata circa 24 ore prima del saggio. La tosatura o la rasatura usualmente deve essere ripetuta ad intervalli approssimativamente settimanali.

Durante la tosatura o la rasatura del pelo, occore fare attenzione a non scorticare la pelle. La superficie corporea da trattare per l'applicazione della sostanza in esame non dovrebbe essere inferiore al 10% del totale. Il peso dell'animale dovrebbe essere preso in considerazione quando si decidono le dimensioni delle superficie da liberare dal pelo e dalla copertura. Quando si saggiano solidi, che possono essere polverizzati se del caso, la sostanza in esame dovrebbe essere umidificata sufficientemente con l'acqua o, se necessario, con un veicolo adatto per assicurare un buon contatto con la pelle. Le sostanze in esame liquide sono in genere usate non diluite. L'applicazione quotidiana si estenderà da 5 a 7 giorni per settimana.

Condizioni sperimentali

Animali da esperimento

Si possono utilizzare esemplari adulti di ratto, coniglio o cavia. Altre specie possono essere utilizzate, ma il loro uso richiede una giustificazione. All'inizio del saggio, la gamma di variazione del peso dovrebbe essere ± 20% del peso medio. Quando uno studio di tossicità subcronica cutanea viene condotto come preliminare ad uno studio a lungo termine, in entrambi gli studi si dovrebbe usare la stessa specie e lo stesso ceppo.

Numero e sesso

Per ciascun livello di dose si dovrebbero utilizzare almeno 20 animali (10 maschi e 10 femmine) con pelle sana. Le femmine dovrebbero essere nullipare e non gravide. Se si prevede di sacrificare ad intervalli alcuni animali, il numero totale dovrebbe essere aumentato del numero di animali che si prevede di sacrificare prima del completamento dello studio. Inoltre, un gruppo satellite di 20 animali (10 animali per sesso) può essere trattato con il livello di dose elevato per 90 giorni e sottoposto ad osservazione per l'individuazione della reversibilità, della persistenza o dell'insorgenza ritardata di effetti tossici per 28 giorni dopo il trattamento.

Livelli di dose

Almeno tre livelli di dose con un controllo o un controllo del veicolo, se si utilizza un veicolo, sono richiesti. Il periodo di esposizione dovrebbe essere di almeno 6 ore al giorno. L'applicazione della sostanza in esame dovrebbe essere eseguita ogni giorno alla stessa ora e la quantità di sostanza applicata dovrebbe essere aggiustata a intervalli (settimanali o bisettimanali) per mantenere un livello costante di dose in termini di peso corporeo dell'animale. Eccezion fatta per il trattamento con la sostanza in esame, gli animali nel gruppo di controllo dovrebbero essere trattati in modo identico ai soggetti dei gruppi trattati. Quando per facilitare il dosaggio si usa un veicolo, il gruppo di controllo del veicolo dovrebbe essere sottoposto a dosaggio come i gruppi trattati, e ricevere la stessa quantità che riceve il gruppo a livello di dose più elevata. Il livello di dose più elevato dovrebbe provocare effetti tossici ma produrre pochi o nessun decesso. Il livello di dose più basso non dovrebbe produrre effetti tossici. Quando esista una valutazione utile di esposizione umana, il livello più basso dovrebbe superare questo valore.

Idealmente, il livello di dose intermedio dovrebbe produrre effetti tossici osservabili minimi. Se viene usata più di una dose intermedia, i livelli di dose dovrebbero essere intervallati per produrre una graduazione degli effetti tossici. Nei gruppi trattati con livello di dose basso, intermedio e nei controlli, l'incidenza delle morti dovrà essere bassa e tale da permettere una valutazione significativa dei risultati.

Se l'applicazione della sostanze in esame produce irritazioni gravi della pelle, le concentrazioni dovrebbero essere ridotte e ciò può provocare una riduzione, o l'assenza, di altri effetti tossici al livello di dose elevato. Se la pelle è stata gravemente danneggiata, può rendersi necessaria l'interruzione dello studio. Si procederà quindi a un nuovo studio con concentrazioni più basse.

Saggio limite

Se uno studio preliminare con livello di dose di 1 000 mg/kg o un livello di dose più elevato in relazione a una possibile esposizione umana, quando questa sia nota, non produce effetti tossici, ulteriori prove possono non essere considerate necessarie.

Periodo di osservazione

Gli animali da esperimento dovrebbero essere osservati quotidianamente per individuare eventuali segni di tossicità. Il tempo della morte e quello dell'insorgenza o della scomparsa dei segni di tossicità dovrebbero essere registrati.

Procedimento

Gli animali dovrebbero essere ingabbiati individualmente e sottoposti a trattamento con la sostanza in esame, idealmente 7 giorni per settimana, per un periodo di 90 giorni.

Gli animali appartenenti a ciascun gruppo satellite previsto per ulteriori osservazioni dovrebbero essere mantenuti ancora per 28 giorni per individuare i sintomi di guarigione oppure di persistenza degli effetti tossici. Il tempo di esposizione dovrebbe essere 6 ore/giorno.

La sostanza in esame dovrebbe essere applicata uniformemente su un'area che è approssimativamente il 10 % della superficie corporea totale. Con sostanze molto tossiche, la superficie coperta può essere inferiore, ma deve comunque essere coperta da uno strato più uniforme e più sottile possibile.

Durante l'esposizione, la sostanza in esame viene tenuta a contatto con la pelle da una fascia porosa di garza e da un nastro non-irritante. La superficie cutanea su cui è applicata la sostanza dovrebbe essere coperta opportunamente in modo da trattenere la fascia e la sostanza in esame, per evitare un'eventuale ingestione da parte degli animali della sostanza in esame. Si può ricorrere a mezzi per limitare i movimenti dell'animale, ma l'immobilizzazione completa non è un metodo raccomandato.

Alla fine del periodo di esposizione, la sostanza in esame residua dovrebbe essere rimossa, ove possibile, con l'uso di acqua o con qualche altro metodo appropriato per pulire la pelle.

Tutti gli animali dovrebbero essere quotidianamente sottoposti a osservazione e si dovrebbe registrare i segni di tossicità, incluso il tempo d'insorgenza, l'intensità e la durata. Le osservazioni collaterali dovrebbero includere i cambiamenti della cute e del pelo, degli occhi e delle mucose, anche del sistema nervoso centrale e autonomo, del sistema respiratorio e circolatorio, dell'attività somatomotoria e del quadro comportamentale. Si dovrebbe procedere settimanalmente alla misura del consumo alimentare e alla pesatura degli animali. L'osservazione regolare degli animali è necessaria per assicurarsi che gli stessi non siano persi a causa di cannibalismo, autolisi dei tessuti o smarrimento. Alla fine del periodo di studio tutti gli animali sopravvissuti dei gruppi di trattamento non satelliti sono sottoposti a necroscopia. Gli animali moribondi dovrebbero essere rimossi e sottoposti a necroscopia.

I seguenti esami vengono effettuati abitualmente per tutti gli animali, compresi i controlli:

a) l'esame oftalmoscopico, eseguito con un oftalmoscopio o attrezzatura analoga, dovrebbe essere effettuato prima della somministrazione della sostanza sperimentale e alla conclusione dello studio, preferibilmente su tutti gli animali, o perlomeno su quelli a cui vengono somministrati il dosaggio elevato, e infine al gruppo di controllo. Se vengono individuati cambiamenti negli occhi, tutti gli animali dovrebbero essere esaminati;

b) alla fine del periodo di saggio, si dovrebbero effettuare le seguenti analisi: ematologia, incluso ematocrito, concentrazione di emoglobina degli eritrociti, conteggio totale e differenziale dei leucociti, misurazione del potenziale di coagulazione, quale il tempo di coagulazione, il tempo di protrombina, il tempo di tromboplastina o il conteggio delle piastrine;

c) la determinazione della biochimica clinica sul sangue dovrebbe essere effettuata alla fine del periodo di saggio. Le aree di studio, ritenute opportune per tutti gli studi sono: equilibrio degli elettroliti, metabolismo dei carboidrati, funzione epatica e renale. La selezione di prove specifiche sarà determinata dalle osservazioni sul modo di azione della sostanza. Si suggerisce di determinare: calcio, fosforo, cloruro, sodio, potassio, glucosio a digiuno (con periodo di digiuno appropriato alla specie), glutamminico-piruvica transaminasi serica [1], glutamminico-ossalacetico transaminasi serica [2], ornitina decarbossilasi, gamma glutammil transpeptidasi, azoto ureico, albumina, creatinina ematica, bilirubina totale e proteine totali del siero. Altre determinazioni che possono rendersi necessarie per una valutazione tossicologica adeguata, includono: analisi dei lipidi, ormoni, equilibrio acido/base, metaemoglobina, attività della colinesterasi. Determinazioni biochimiche supplementari possono essere usate, se necessarie, per estendere la ricerca di effetti osservati;

d) l'analisi delle urine non è richiesta routinariamente, ma solo quando vi sia una indicazione basata sulla tossicità prevista o osservata. Se i dati storici di base sono insufficienti, prima di iniziare il dosaggio si dovrebbe prendere in considerazione la determinazione dei parametri ematologici e di biochimica clinica.

Necroscopia macroscopica

Tutti gli animali dovrebbero essere sottoposti a necroscopia macroscopica completa, che include l'esame della superficie esterna del corpo, di tutti gli orifizi e delle cavità cranica, toracica e addominale e dei loro contenuti. Il fegato, i reni, le ghiandole surrenali e i testicoli devono essere pesati umidi, appena possibile dopo la dissezione, per evitare l'essiccamento. I seguenti organi e tessuti dovrebbero essere conservati in mezzo adatto per possibili esami istopatologici futuri: tutte le lesioni macroscopiche; cervello — comprese sezioni di midollo/ponte, corteccia cerebellare e corteccia cerebrale, pituitaria, tiroide/paratiroide, qualsiasi tessuto timico, (trachea), polmoni, cuore, aorta, ghiandole salivari, fegato, milza, reni, ghiandole surrenali, pancreas, gonadi, utero, organi genitali accessori, cistifellea (se esiste), esofago, stomaco, duodeno, digiuno, ileo, intestino cieco, colon, retto, vescica urinaria, linfonodi rappresentativi, (ghiandole mammarie femminili), (muscolatura della coscia), nervo periferico (occhi), (sterno con midollo osseo), (femore — compresa superficie articolare), (midollo spinale a tre livelli — cervicale, emitoracico e lombare) e (ghiandole lacrimali esorbitali). (I tessuti citati tra parentesi devono essere esaminati solo se presentano sintomi di tossicità o se vi siano indicazioni che sono l'organo-bersaglio coinvolto).

Esame istopatologico

a) L'esame istopatologico completo dovrebbe essere effettuato sulla cute normale e sulla cute trattata, e sugli organi e tessuti degli animali nel gruppo trattato con dosaggio elevato e nel gruppo di controllo;

b) tutte le lesioni macroscopiche dovrebbero essere esaminate;

c) gli organi-bersaglio dovrebbero essere esaminati anche nei gruppi trattati con altre dosi;

d) quando si usano i ratti, si dovrebbe eseguire l'esame istopatologico dei polmoni degli animali dei gruppi trattati con dosaggi bassi e intermedi per l'individuazione di infezioni poiché ciò fornisce una valutazione appropriata dello stato di salute degli animali. Ulteriori esami istopatologici di routine possono non essere richiesti per gli animali di questi gruppi, ma devono sempre essere effettuati sugli organi che presentano lesioni nel gruppo trattato con dosi elevate;

e) quando si fa uso di un gruppo satellite, si dovrebbe eseguire l'esame istopatologico dei tessuti e degli organi che presentano lesioni in altri gruppi trattati.

2. DATI

I dati dovrebbero essere riassunti sotto forma di tabelle, indicando per ogni gruppo sperimentale il numero di animali all'inizio del saggio, il numero di animali che presentano lesioni, il tipo di lesioni e la percentuale degli animali che presentano ciascun tipo di lesione. I risultati dovrebbero essere valutati con un metodo statistico appropriato. Qualsiasi metodo statistico riconosciuto può essere utilizzato.

3. **RELAZIONE**

3.1. **Relazione sul saggio**

Nella relazione sul saggio devono figurare, se possibile:

— specie, ceppo, origine, condizioni ambientali, dieta,

— condizione sperimentali,

— livello di dose (veicolo compreso, se utilizzato) e concentrazioni,

— dati sulla risposta tossica per sesso e per dose,

— livello senza effetto, quando possibile,

— tempo della morte (durante l'esperimento) oppure specificare se gli animali sono sopravvissuti fino alla conclusione della prova,

— descrizione degli effetti tossici o di altri effetti,

— tempo di osservazione di ogni segno anormale e successivo decorso,

— dati di alimentazione e sul peso corporeo,

— risultati oftalmologici,

— analisi ematologiche usate e risultati completi,

— analisi di biochimica clinica usati e risultati completi (compresi i risultati dell'analisi delle urine),

— risultati della necroscopia,

— descrizione particolareggiata di tutti di risultati istopatologico,

— elaborazione statistica dei risultati, quando possibile,

— discussione dei risultati,

— interpretazione dei risultati.

3.2. **Valutazione ed interpretazione**

Vedi introduzione generale, parte B.

4. **RIFERIMENTI**

Vedi introduzione generale, parte B.

SAGGIO DI TOSSICITÀ SUBCRONICA INALATORIA

SAGGIO CON SOMMINISTRAZIONE INALATORIA RIPETUTA DI DOSI PER 90 GIORNI USANDO SPECIE DI RODITORI

1. METODO

1.1. **Introduzione**

Vedi introduzione generale, parte B.

1.2. **Definizioni**

Vedi introduzione generale, parte B.

1.3. **Sostanze di riferimento**

Nessuna.

1.4. **Principi del metodo di saggio**

Diversi gruppi di animali da esperimento sono esposti quotidianamente per un periodo definito alla sostanza in esame in concentrazioni graduate, utilizzando una concentrazione per gruppo, per un periodo di 90 giorni. Quando si utilizza un veicolo per contribuire a generare una concentrazione appropriata della sostanza in esame nell'atmosfera, si dovrebbe utilizzare un gruppo di controllo per il veicolo. Durante il periodo di somministrazione, gli animali vengono giornalmente sottoposti ad osservazione per individuare segni di tossicità. Gli animali che muoiono durante il saggio sono sottoposti a necroscopia; alla conclusione del saggio anche gli animali superstiti vengono sottoposti a necroscopia.

1.5. **Criteri qualitativi**

Nessuno.

1.6. **Descrizione del metodo di saggio**

Preparazioni

Gli animali sono tenuti nelle condizioni di alloggiamento e di alimentazione sperimentali per almeno cinque giorni prima dell'inizio della prova. Prima del saggio, animali giovani e sani sono mischiati con metodo casuale ed assegnati ai gruppi di trattamento e di controllo.

Se necessario, un veicolo adatto può essere aggiunto alla sostanza in esame per contribuire a generare una concentrazione appropriata della sostanza nell'atmosfera. Se un veicolo o altri additivi vengono utilizzati per facilitare il dosaggio, essi dovrebbero essere noti per non produrre effetti tossici. Se del caso, i dati storici possono essere usati.

Condizioni sperimentali

Animali sperimentali

A meno che vi siano controindicazioni, la specie preferita è il ratto. Si dovrebbero usare animali sani giovani di ceppi comunemente usati in laboratorio. All'inizio dello studio la gamma di variazione del peso degli animali usati non dovrebbe essere superiore al ± 20 % del peso medio. Quando venga intrapreso uno studio subcronico per inalazione come preliminare ad uno studio a lungo termine, in entrambi gli studi si dovrebbe usare la stessa specie e stesso ceppo.

Numero e sesso

Per ciascuna concentrazione di esposizione si dovrebbero utilizzare almeno 20 animali (10 femmine e 10 maschi). Le femmine dovrebbero essere nullipare e non gravide. Se si prevede di sacrificare ad intervalli alcuni animali il numero dovrebbe essere aumentato del numero di animali che si prevede di sacrificare prima del completamento dello studio. Inoltre, un gruppo satellite di 20 animali (10 animali per sesso) può essere trattato con il livello di dose elevato per 90 giorni e sottoposto ad osservazione per l'individuazione della reversibilità, della persistenza o dell'insorgenza ritardata di effetti tossici per 28 giorni dopo il trattamento.

Concentrazione di esposizione

Sono richieste almeno tre concentrazioni, con un controllo o un controllo del veicolo (che corrisponde alla concentrazione del veicolo al livello più elevato) se si utilizza un veicolo. Eccezion fatta per il trattamento con la sostanza in esame, gli animali nel gruppo di controllo dovrebbero essere trattati in modo identico agli animali dei gruppi. La concentrazione più elevata dovrebbe provocare effetti tossici ma nessuna o poche morti. Quando esista una valutazione utile dell'esposizione umana, la concentrazione più bassa dovrebbe superare detto valore. Idealmente la concentrazione media dovrebbe produrre effetti tossici osservabili minimi. Se viene usata più di una concentrazione intermedia le concentrazioni dovrebbero essere intervallate per produrre una graduazione di effetti tossici.

Nei gruppi trattati con concentrazioni basse ed intermedie e nei controlli, l'incidenza delle morti dovrebbe essere bassa per permettere una valutazione significativa dei risultati.

Tempo di esposizione

La durata dell'esposizione quotidiana dovrebbe essere di 6 ore, dopo la stabilizzazione delle concentrazione delle camere di inalazione. Altri tempi di esposizione possono essere usati per esigenze specifiche.

Gli esperimenti sugli animali dovrebbero essere effettuati in apparecchiatura per inalazione progettata per sostenere una corrente dinamica d'aria con almeno 12 cambiamenti d'aria l'ora per assicurare un tenore di ossigeno adeguato e un'atmosfera di esposizione a distribuzione uniforme. Quando si usa una camera di inalazione la progettazione dovrebbe essere tale da evitare l'affollamento degli animali e di aumentare al massimo la loro esposizione per inalazione alla sostanza in esame. Di massima, per assicurare la stabilità dell'atmosfera della camera, il «volume» totale degli animali di saggio non dovrebbe superare il 5 % del volume della camera di prova. Si può usare il sistema di esposizione oro-nasale, della testa soltanto o del corpo intero; i primi due sistemi ridurranno al massimo l'assorbimento da altre vie.

Periodo di osservazione

Gli animali sperimentali dovrebbero quotidianamente essere sottoposti ad osservazione per individuare i segni di tossicità durante l'interno periodo di trattamento e di recupero. Si dovrebbe registrare anche il tempo della morte e quello dell'insorgenza o della scomparsa dei segni di tossicità.

Procedimento

Gli animali vengono esposti alla sostanza in esame 5-7 giorni per settimana, per un periodo di 90 giorni. Gli animali appartenenti ai gruppi satelliti previsti per ulteriori osservazioni dovrebbero essere tenuti ancora per 28 giorni senza trattamento per individuare la guarigione o la persistenza degli effetti tossici. La temperatura durante la prova dovrebbe essere mantenuta a 22 °C (± 3 °C). Idealmente, l'umidità relativa dovrà essere mantenuta tra il 30 % ed il 70 %, ma in certi casi (ad esempio, saggi di aerosols) ciò potrebbe non essere possibile. Il cibo e l'acqua non dovrebbero essere somministrati durante l'esposizione.

Si dovrebbe usare un sistema dinamico con un idoneo sistema di controllo analitico della concentrazione. Per stabilire le opportune concentrazioni di esposizione si raccomanda di effettuare una prova. Il flusso d'aria dovrebbe essere regolato in modo da garantire che le condizioni nella camera d'esposizione siano omogenee. Il sistema dovrebbe garantire che condizioni stabili di esposizione siano realizzate il più rapidamente possibile.

Si dovrebbero misurare e controllare:

a) la velocità della corrente d'aria (in continuo);

b) la concentrazione reale della sostanza in esame misurata nella zona di respirazione. Durante il periodo di esposizione quotidiana, la concentrazione non dovrebbe subire variazioni più del ± 15 % del valore medio. Tuttavia, nel caso delle polveri e degli aerosols questo livello di controllo potrebbe non essere realizzabile e un più vasto intervallo sarebbe quindi accettabile. Durante tutto il periodo dello studio la concentrazione giornaliera dovrebbe essere tenuta costante nei limiti del possibile. Durante la messa a punto del sistema di generazione si dovrebbe eseguire l'analisi delle dimensioni e delle particelle per stabilire la stabilità delle concentrazioni di aerosol. Durante l'esposizione, le analisi dovrebbero essere effettuate con la necessaria frequenza per determinare l'uniformità di distribuzione delle dimensioni delle particelle;

c) temperatura ed umidità;

d) durante e dopo l'esposizione le osservazioni sono effettuate e registrate sistematicamente; per ogni animale si dovrebbero tenere registri individuali. Tutti gli animali dovrebbero essere osservati quotidianamente e si dovrebbero registrare i segni di tossicità, incluso il tempo di insorgenza, il grado e la durata. Le osservazioni collaterali dovrebbero includere i cambiamenti della cute e del pelo, degli occhi e delle mucose nonché del sistema nervoso centrale ed autonomo, di quello respiratorio e circolatorio, dell'attività somatomotoria e del quadro comportamentale. Si dovrebbe procedere settimanalmente alla misura del consumo alimentare ed alla pesatura degli animali. L'osservazione regolare degli animali è necessaria per assicurare che gli stessi non siano

persi per lo studio a causa di cannibalismo, autolisi dei tessuti o smarrimento. Alla fine del periodo di studio tutti gli animali sopravvissuti sono sottoposti a necroscopia. Gli animali moribondi dovrebbero essere rimossi e sottoposti a necroscopia, quando notati.

I seguenti esami vengono effettuati abitualmente per tutti gli animali, compresi i controlli:

a) l'esame oftalmoscopico, eseguito con un oftalmoscopio o idonea attrezzatura analoga, dovrebbe essere effettuato prima dell'esposizione alla sostanza in esame e alla conclusione dello studio, preferibilmente su tutti gli animali o perlomeno su quelli cui viene somministrato il dosaggio elevato e al gruppo di controllo. Se vengono individuati cambiamenti agli occhi tutti gli animali dovrebbero essere esaminati;

b) alla fine del periodo di saggio, si dovrebbero effettuare le seguenti analisi: ematologia, incluso ematocrito, concentrazione di emoglobina, conteggio degli eritrociti, conteggio totale e differenziale dei leucociti, misura del potenziale di coagulazione, quale il tempo di coagulazione, il tempo di protrombina, il tempo di tromboplastina o conteggio delle piastrine;

c) la determinazione della biochimica clinica sul sangue dovrebbe essere effettuata alla fine del periodo di saggio. Le aree di saggio che sono considerate opportune per tutti gli studi sono: equilibrio degli elettroliti, metabolismo dei carboidrati, funzione epatica e renale. La selezione delle prove specifiche sarà determinata dalle osservazioni sul modo di azione della sostanza. Si suggerisce di determinare: calcio, fosforo, cloruro, sodio, potassio, glucosio a digiuno (con periodo di digiuno appropriato alla specie), glutammico-piruvico transaminasi serica [1], glutammino-ossalacetico transaminasi serica [2], ornitina decarbossilasi, gamma glutammil transpeptidase, azoto ureico, albumina, creatinina nel sangue, bilirubina totale e misurazione delle proteine totali del siero. Altre determinazioni che possono rendersi necessarie per una valutazione tossicologica adeguata, includono analisi dei lipidi, ormoni, equilibrio acido/base, metaemoglobina, attività della colinesterasi. Determinazione biochimiche supplementari possono essere usate, se necessario, per estendere la ricerca sugli effetti osservati;

d) l'analisi delle urine non è richiesta routinariamente, ma solo quando vi siano indicazioni basate sulla tossicità prevista o osservata.

Se i dati storici di base sono insufficienti, prima di iniziare il dosaggio si dovrebbe prendere in considerazione la determinazione dei parametri ematologici e di biochimica clinica.

Necroscopia macroscopica

Tutti gli animali dovrebbero essere sottoposti a necroscopia macroscopica completa, che include l'esame della superficie esterna del corpo, di tutti gli orifizi e delle cavità cranica, toracica e addominale e dei loro contenuti. Il fegato, i reni, le ghiandole surrenali e i testicoli dovranno essere pesati umidi, appena possibile dopo la dissezione, per evitare l'essiccamento. I seguenti organi e tessuti dovrebbero essere conservati in mezzo adatto per possibili esami istopatologici futuri: tutte le lesioni generali, polmoni — che dovrebbero essere rimossi intatti, pesati e trattati con un fissativo adatto per garantire che la struttura polmonare rimanga intatta (la perfusione con fissativo è considerata un procedimento efficace), tessuti rinofaringei, cervello — comprese sezioni di midollo/ponte, corteccia cerebellare e corteccia cerebrale, pituitaria, tiroide/paratiroide, qualsiasi tessuto timico, trachea e polmoni, cuore, aorta, ghiandole salivari, milza, fegato, reni, ghiandole surrenali, pancreas, gonadi, utero, (organi genitali accessori), (pelle), cistifellea (se presente), esofago, stomaco; duodeno, digiuno, ileo, intestino cieco, colon, retto, vescica urinaria, linfonodi rappresentativi, (ghiandole mammarie femminili), (muscolatura della coscia), nervo periferico (occhi), sterno con midollo osseo, (femore — compresa superficie articolare), (midollo spinale a tre livelli — cervicale, emitoracico e lombare), e (ghiandole lacrimali esorbitali). (I tessuti citati tra parentesi devono essere esaminati solo se presentano segni di tossicità o se vi siano indicazioni che sono l'organo-bersaglio coinvolto).

Esame istopatologico

a) L'esame istopatologico completo dovrebbe essere effettuato sulle vie respiratorie e su altri organi e tessuti di tutti gli animali nel gruppo trattato con dosaggio elevato e nel gruppo di controllo;

b) tutte le lesioni macroscopiche dovrebbero essere esaminate;

c) gli organi-bersaglio in gruppi trattati con altre dosi dovrebbero essere esaminati;

d) i polmoni degli animali nei gruppi trattati con dosaggio basso ed intermedio dovrebbero essere sottoposti ad esame istopatologico per l'individuazione di infezioni, poiché ciò fornisce una valutazione appropriata dello stato di salute degli animali. Ulteriori esami istopatologici di routine possono non essere richiesti per gli animali di questi gruppi, ma devono sempre essere effettuati sugli organi che presentano lesioni nel gruppo trattato con dose elevata;

e) quando si fa uso di gruppo satellite, si dovrebbe eseguire l'esame istopatologico degli stessi tessuti e degli organi che presentano effetti in altri gruppi trattati.

---

(1) Ora nota come alanina aminotransferasi serica

(2) Ora nota come aspartato aminotransferasi serica

2. DATI

I dati dovrebbero essere riassunti sotto forma di tabelle, indicando per ogni gruppo di saggio il numero di animali all'inizio del saggio, il numero degli animali che presentano lesioni, i tipi di lesione e la percentuale degli animali che presenta ciascun tipo di lesioni. I risultati dovrebbero essere valutati con un metodo statistico idoneo. Qualsiasi metodo statistico riconosciuto può essere utilizzato.

3. RELAZIONE

3.1. Relazione sul saggio

Nella relazione sul saggio devono figurare, se possibile:

— specie, ceppo, origine, condizioni ambientali, dieta;

— condizioni sperimentali:

descrizione dell'apparecchiatura di esposizione inclusi progettazione, tipo, dimensioni, generatore dell'aria, sistema di generazione delle particelle e degli aerosols, metodo di condizionamento dell'aria, trattamento dell'aria di scarico e metodo di alloggiamento degli animali in una camera di saggio, quando questa sia usata. L'attrezzatura per la misura della temperatura, dell'umidità e, se del caso, della stabilità delle concentrazioni di aerosol o delle dimensioni delle particelle dovrebbe essere descritta;

dati di esposizione: i dati dovrebbero essere tabulati presentati con valori medi e una misura della variabilità (per esempio deviazione standard) e dovrebbero includere:

a) velocità del flusso dell'aria attraverso l'attrezzatura per l'inalazione,

b) temperatura ed umidità dell'aria,

c) concentrazioni nominali (quantità totale della sostanza in esame immessa nell'apparecchiatura per l'inalazione, divisa per il volume dell'aria),

d) natura del veicolo, se usato,

e) concentrazione reali nella zona di respirazione,

f) dimensioni delle particelle mediane (se del caso);

— dati sulla risposta tossica per sesso e per concentrazione;

— livello senza effetto, quando possibile;

— tempo della morte (durante l'esperimento) oppure specificare se gli animali sono sopravvissuti fino alle conclusione della prova;

— descrizione degli effetti tossici o di altri effetti;

— tempo di osservazione di ogni segno anomalo e successivo decorso;

— dati di alimentazione sul peso corporeo;

— risultati oftalmologici;

— prove ematologiche usate e risultati completi;

— prove di biochimica clinica usate e risultati (compresi i risultati dell'analisi delle urine);

— risultati della necroscopia,

— descrizione particolareggiata di tutti i risultati istopatologici;

— elaborazione statistica dei risultati, quando possibile;

— discussione dei risultati;

— interpretazione dei risultati.

3.2. Valutazione ed interpretazione

Vedi introduzione generale, parte B.

RIFERIMENTI

Vedi introduzione generale, parte B.

SAGGIO DI TERATOGENESI: RODITORI E NON-RODITORI

1. METODO

1.1. Introduzione

Vedi introduzione generale, parte B.

1.2. Definizioni

Vedi introduzione generale, parte B.

1.3. Sostanze di riferimento

Nessuna.

1.4. Principi del metodo di saggio

La sostanza sperimentale viene somministrata in dosi o concentrazioni graduate, per almeno quella parte della gravidanza che copre il periodo dell'organogenesi, a diversi gruppi di animali sperimentali gravidi, una dose per gruppo. Poco prima della data prevista del parto l'animali viene ucciso, l'utero tolto ed il contenuto esaminato. Questo metodo sperimentale copre la embriotossicità e la fetotossicità.

1.5. Criteri qualitativi

Nessuno.

1.6. Descrizione del metodo di saggio

Preparazioni

Le giovani femmine vergini adulte in buona salute, di età e dimensioni comparabili, vengono acclimatate in condizioni di laboratorio per almeno 5 giorni prima dello studio; vengono poi accoppiate con maschi di comprovata fertilità. Le femmine inseminate vengono randomizzate ed assegnate ai gruppi di trattamento. L'accoppiamento può avvenire naturalmente o tramite inseminazione artificiale. La sostanza da saggiare viene somministrata ogni giorno alle femmine, immediatamente dopo l'impianto e durante l'intero periodo dell'organogenesi. Un giorno prima del termine, i feti vengono asportati con isterectomia ed esaminati per determinare eventuali anomalie viscerali o scheletriche, includendo ossificazione ritardata, ritardo della crescita ed emorragie intestinali.

Condizioni sperimentali

Animali da laboratorio

La specie generalmente usate sono il ratto, il topo, il criceto ed il coniglio. Le specie preferite sono il ratto ed il coniglio. Sarà opportuno usare ceppi generalmente utilizzati in laboratorio. Il ceppo non dovrà essere a bassa fecondità e dovrà essere caratterizzato per la sua risposta ai teratogeni. Gli animali dovranno essere ingabbiati individualmente.

Numero e sesso

Per ogni livello di dose si richiedono almeno 20 femmine di ratto, di *topo o di criceto gravide*, oppure 12 coniglie. L'obiettivo è di assicurare un numero sufficiente di parti per permettere una valutazione del potenziale teratogeno della sostanza.

Livelli di dose

Si richiedono almeno 3 gruppi di dosaggio e un gruppo di controllo. Quando la sostanza da saggiare è somministrata in un veicolo, si richiede anche un gruppo di controllo del veicolo. Se si utilizza un veicolo, le sue proprietà tossicologiche dovranno essere note; esso non dovrà essere teratogeno né avere effetti sulla riproduzione. Ad eccezione del trattamento con la sostanza da saggiare, gli animali nel gruppo di controllo dovranno essere

trattati in modo identico agli animali del gruppo trattato. A meno che non sia limitato dalla natura fisico/chimica o dalle proprietà biologiche della sostanza, il livello più elevato di dose dovrà idealmente indurre una certa tossicità materna evidente, quale una leggera perdita del peso, ma non più del 10 % di morti. Il livello basso di dose non dovrà indurre effetti osservabili attribuibili alla sostanza da saggiare. La dose intermedia dovrà essere intervallata geometricamente tra i livelli di dose elevati e quelli bassi.

Prova limite

Nel caso di sostanza a bassa tossicità, se un livello di dose di almeno 1 000 mg/kg non produce sintomi di embriotossicità o di teratogenicità, prove con altri livelli di dose possono essere considerate superflue.

Tempo di esposizione

Il giorno 0 nella prova è il giorno in cui sono osservati (se possibile) il tappo vaginale e/o lo sperma. Il periodo in cui si somministra la dose dovrebbe riguardare il periodo principale dell'organogenesi. Per il ratto ed il topo, questo può essere compreso fra il 6° e il 15° giorno; tra il 6° e il 14° per il criceto, e per il coniglio tra il 6° e il 18°. Se il giorno 0 è quello in cui si è osservato l'accoppiamento o l'inseminazione artificiale, ai tempi di cui sopra si dovrà aggiungere 1 giorno. Alternativamente, il periodo del dosaggio può essere esteso approssimativamente di 1 giorno prima della data prevista per il parto.

Periodo di osservazione

Un accurato esame clinico dovrà essere fatto almeno una volta al giorno. Osservazioni supplementari dovranno avvenire quotidianamente, con azioni appropriate prese per minimizzare la perdita di animali durante l'esperimento.

Procedimento

La sostanza da saggiare è somministrata oralmente, con sonda.

La sostanza da saggiare dovrà essere somministrata approssimativamente ogni giorno alla stessa ora.

Agli animali la laboratorio di sesso femminile viene somministrata ogni giorno la sostanza da saggiare, durante il periodo prescritto. La dose può essere basata sul peso delle femmine all'inizio della somministrazione della sostanze, o, alternativamente, in vista del rapido aumento di peso che ha luogo durante la gravidanza, gli animali possono essere pesati periodicamente, ed il dosaggio basato sulla determinazione più recente del peso. I sintomi di tossicità dovranno essere registrati al momento dell'osservazione, insieme con la data di inizio, il grado e la durata. Le femmine che minacciano l'aborto o il parto prematuro dovranno essere sacrificate e sottoposte ad esame macroscopico accurato. Il periodo di osservazione post-trattamento dovrà continuare fino a circa un giorno prima del termine; l'obiettivo è di coprire la maggior parte del periodo di gravidanza, ma di evitare eventuali complicazioni di interpretazione dei risultati che potrebbero sorgere in seguito alle nascite naturali. Le osservazioni parallele includeranno, ma con si limiteranno a: modificazione della cute e del pelo, degli occhi e delle mucose, nonché del sistema nervoso centrale ed autonomo, di quello respiratorio e circolatorio, dell'attività somatomotoria e del modello comportamentale. Si dovrebbe procedere settimanalmente alla misura del consumo alimentare e alla pesatura degli animali.

Necroscopia macroscopica

Alla morte, durante, o alla fine dello studio, l'animale dovrà essere sottoposto ad esame macroscopico per identificare tutte le anomalie strutturali o le modificazioni patologiche che hanno potuto influenzare la gravidanza. Immediatamente dopo la morte, l'utero dovrà essere tolto ed il contenuto esaminato per eventuale constatazione di morte dell'embrione o del feto e del numero di feti vivi. In genere, è possibile stimare la data di morte nell'utero, quando questa si è verificata. Nei ratti e nei conigli è possibile determinare il numero dei corpi lutei.

Si determinerà il sesso dei feti, si eseguirà la relativa pesatura individuale con registrazione e derivazione del peso fetale medio. Dopo la rimozione ogni feto dovrà essere esaminato esternamente. Per i ratti, i topi e i criceti, la metà di ogni figliata dovrà essere preparata per l'osservazione di anomalie scheletriche, e la parte rimanente di ogni figliata verrà preparata per l'osservazione di anomalie o sintomi di eventuale disfacimento tissulare usando metodi appropriati. Per i conigli, ogni feto verrà esaminato con accurata dissezione per il riscontro di anomalie viscerali e di anomalie scheletriche.

2. DATI

I dati devono essere riassunti sotto forma di tabelle, indicando per ogni gruppo sperimentale il numero di animali all'inizio della prova, il numero di quelli divenuti gravidi, il numero e le percentuali dei feti vivi e dei feti che presentano anomalie scheletriche o disfacimento tissulare nonché la loro relazione con figliate specifiche. I risultati devono essere valutati con un metodo statistico idoneo. Qualsiasi metodo statistico riconosciuto può essere utilizzato.

3. **RELAZIONE**

3.1. **Relazione sul saggio**

Nella relazione sul saggio devono figurare, se possibile:

— specie, ceppo, origine, condizioni ambientali, dieta, ecc.,

— condizioni sperimentali,

— livelli di dose (veicolo compreso, se utilizzato) e concentrazioni,

— dati sulla risposta tossica per dose,

— livello senza effetto (quando possibile),

— registrazione della data della morte durante lo studio oppure specificare se gli animali sono sopravvissuti fino alla conclusione della prova,

— descrizione degli effetti tossici o di altri effetti,

— registrazione della data di osservazione di ogni sintomo anomalo e successivo decorso,

— dati sulla alimentazione e sul peso corporeo,

— durata della gravidanza e dati sulle figliate (inclusi dati storici),

— dati fetali (vivi/morti, sesso, anomalie dei tessuti molli e anomalie scheletriche),

— dati sulla figliata (vivi/morti, sesso, anomalie dei tessuti molli e anomalie scheletriche),

— elaborazione statistica dei risultati quando possibile,

— discussione dei risultati,

— interpretazione dei risultati.

3.2. **Valutazione ed interpretazione**

Vedi introduzione generale, parte B.

4. **RIFERIMENTI**

Vedi introduzione generale, parte B.

SAGGIO DI TOSSICITÀ CRONICA

1. METODO

1.1. Introduzione

Vedi introduzione generale, parte B.

1.2. Definizioni

Vedi introduzione generale, parte B.

1.3. Sostanze di riferimento

Nessuna.

1.4. Principio del metodo di saggio

La sostanza in esame è somministrata normalmente 7 giorni per settimana, per una via opportuna, a diversi gruppi di animali sperimentali, una dose per gruppo, per la maggior parte della loro durata di vita. Durante e dopo l'esposizione alla sostanza in esame, gli animali sperimentali sono sottoposti ad osservazione quotidianamente per individuare segni di tossicità.

1.5. Criteri qualitativi

Nessuno.

1.6. Descrizione del metodo di saggio

Preparazioni

Gli animali sono tenuti nelle condizioni di alloggiamento e nutrizione sperimentali per almeno 5 giorni prima dell'inizio del saggio. Prima dell'esperimento, gli animali giovani e sani vengono mescolati con metodo casuale ed assegnati a gruppi di trattamento e di controllo.

Condizioni di saggio

Animali da laboratorio

La specie preferita è il ratto. Sulla base dei risultati di studi precedentemente effettuati, altre specie (roditori o non-roditori) possono essere utilizzate. Si dovrebbero usare i ceppi di laboratorio generalmente utilizzati di giovani animali sani ed il dosaggio dovrebbe iniziare non appena possibile dopo lo svezzamento.

All'inizio dello studio, la variazione di peso negli animali usati non dovrebbe superare il ± 20 % del valore medio. Quando venga intrapreso uno studio di tossicità subcronica orale come preliminare ad uno studio a lungo termine, si dovrebbe usare la stessa specie e lo stesso ceppo in entrambi gli studi.

Numero e sesso

Per ciascun livello di dose si dovrebbero utilizzare, per i roditori, almeno 40 animali (20 maschi e 20 femmine) e un gruppo di controllo parallelo. Le femmine dovrebbero essere nullipare e non gravide. Se si prevede di sacrificare alcuni animali, il loro numero dovrà essere aumentato del numero di animali che si prevede di sacrificare prima del completamento dello studio.

Per i non roditori un numero inferiore di animali, almeno 4 per sesso e per gruppo, è accettabile.

Livelli di dose e frequenza dell'esposizione

Si dovrebbero utilizzare almeno tre livelli di dose oltre al gruppo di controllo. Il livello di dose più elevato dovrebbe provocare sintomi precisi di tossicità senza causare eccessiva mortalità. Il livello di dose più basso non dovrebbe produrre alcuna evidenza di tossicità.

La dose (le dosi) intermedia(e) dovrebbe(ro) essere fissata(e) in un intervallo intermedio tra le dosi elevate e quelle basse.

Nella scelta dei livelli di dose si dovrebbe tener conto dei dati ottenuti da precedenti saggi e studi di tossicità.

Normalmente, la frequenza dell'esposizione è quotidiana. Se la sostanza chimica viene somministrata in acqua potabile o mescolata nella dieta, essa dovrebbe essere continuamente disponibile.

Controlli

Si dovrebbe usare un gruppo di controllo parallelo identico sotto tutti i punti di vista ai gruppi esposti, eccezion fatta per l'esposizione alla sostanza in esame.

In circostanze specifiche, come in studi di inalazione che richiedono l'uso di aerosol o di un emulsionante ad attività biologica non caratterizzata in studi orali, si dovrebbe usare anche un gruppo di controllo negativo parallelo. In gruppo di controllo negativo riceve lo stesso trattamento degli altri gruppi di animali sperimentali, eccettuato il fatto che gli animali non sono esposti alla sostanza sperimentale ne ad alcun veicolo.

Vie di somministrazione

Le due vie principali di somministrazione sono quella orale e quella inalatoria. La scelta della via di somministrazione dipende dalle caratteristiche fisiche e chimiche della sostanza in esame e della via probabile di esposizione dell'uomo.

L'uso della via cutanea presenta considerevoli problemi pratici. La tossicità sistematica cronica derivante dall'assorbimento percutaneo può essere arguita normalmente dai risultati dell'altra prova orale e dalla conoscenza dell'entità dell'assorbimento percutaneo derivata dalle prove di tossicità percutanea.

Studi orali

Ove la sostanza in esame sia assorbita dal tratto gastro-intestinale, e se la via orale è una via di esposizione degli esseri umani, la via orale di somministrazione è quella preferita, a meno che non vi siano controindicazioni. Gli animali possono ricevere la sostanza in esame nella loro dieta, sciolta in acqua potabile, o in capsula. Idealmente, dovrebbe essere usato un dosaggio giornaliero, sette giorni per settimana, perché un dosaggio di cinque giorni/settimana potrebbe provocare un recupero o una tossicità da privazione nel periodo di mancato dosaggio, influenzando così il risultato e la valutazione successiva. Tuttavia, sulla base principalmente di considerazioni pratiche, il dosaggio su una base di cinque giorni/settimana è considerato accettabile.

Studi di inalazione

Poiché gli studi sull'inalazione offrono problemi tecnici di maggior complessità delle altre vie di somministrazione, vengono qui fornite indicazioni più particolareggiate su questo modo di somministrazione. Dovrebbe essere notato che l'instillazione endotracheale può costituire un'alternativa valida in situazioni specifiche.

Le esposizioni a lungo termine sono di solito modellate sulla esposizione umana prevista, che prevede per gli animali un'esposizione quotidiana di 6 ore dopo equilibrazione delle concentrazioni nella camera, per 5 giorni/settimana (esposizione intermittente), o su un'esposizione ambientale possibile, con 22-24 ore di esposizione/giorno, 7 giorni/settimana (esposizione continua), con circa un'ora/giorno per nutrire gli animali allo stesso orario e per la manutenzione della camera.

In entrambi i casi, gli animali sono di solito esposti a concentrazioni fisse delle sostanze in esame. Una differenza importante da considerare tra l'esposizione intermittente e quella continua è che, con la prima, vi è un periodo di 17-18 ore in cui gli animali possono riprendersi dagli effetti di ogni esposizione quotidiana, e un periodo di recupero ancora più lungo durante i fine settimana.

La scelta dell'esposizione intermittente o continua dipende dagli obiettivi dello studio e dall'esposizione umana che deve essere simulata. Tuttavia, certe difficoltà tecniche devono essere considerate. Per esempio, i vantaggi dell'esposizione continua per simulare le condizioni ambientali possono essere controbilanciati dalla necessità di nutrire e abbeverare gli animali durante l'esposizione, o di disporre di aerosol di tipo più complicato (e affidabile) e di sistemi di generazione di vapore e di controllo.

Camere di esposizione

Gli animali dovrebbero essere sottoposti a sperimentazione in camere di inalazione progettate per sostenere un flusso dinamico con almeno 12 cambiamenti d'aria/ora, per assicurare un tenore di ossigeno adeguato e un atmosfera di esposizione uniforme. Le camere di esposizione e di controllo dovrebbero essere identiche nella costruzione e nella progettazione, per poter assicurare condizioni di esposizione comparabili sotto tutti gli aspetti, eccezion fatta per l'esposizione alle sostanze in esame. Nella camera viene generalmente mantenuta una leggera depressione per impedire la fuoriuscita delle sostanze in esame nella zona circostante. Nelle camere si dovrebbe ridurre al minimo l'affollamento degli animali. Come regola generale, al fine di assicurare la stabilità dell'atmosfera della camera, il «volume» totale degli animali di saggio non dovrebbe superare il 5% del volume della camera.

Si dovrebbero eseguire le misure o i controlli sottoelencati:

i) Flusso dell'aria: la velocità del flusso d'aria attraverso la camera dovrebbe essere controllata preferibilmente in modo continuo.

ii) Concentrazione: durante il periodo di esposizione quotidiana, la concentrazione della sostanza in esame non dovrebbe variare di più o meno il 15 % del valore medio.

iii) Temperatura ed umidità: per i roditori la temperatura dovrebbe essere mantenuta sui 22 °C (± 2 °C), e l'umidità all'interno della camera al 30-70 %, eccetto quando l'acqua è usata per mantenere in sospensione la sostanza di prova nell'atmosfera della camera. Preferibilmente entrambe dovrebbero essere controllate in continuo.

iv) Misura delle dimensioni delle particelle: la distribuzione delle dimensioni delle particelle dovrebbe essere determinata sulle atmosfere di camere che contengano aerosol liquidi o solidi. Le particelle contenute negli aerosol dovrebbero avere dimensioni tali da essere inalabili dall'animale da laboratorio usato. I campioni di atmosfera dovrebbero essere prelevati a livello della zona di respirazione degli animali. Il campione d'aria dovrebbe essere rappresentativo della distribuzione delle particelle a cui gli animali sono esposti e dovrebbe rappresentare, su una base gravimetrica, tutto l'aerosol sospeso anche quando gran parte di esso non è respirabile. Le analisi della grandezza delle particelle dovrebbero essere effettuate spesso durante la messa a punto del sistema di generazione per assicurare la stabilità dell'aerosol e, in seguito, quando si ritenga necessario, durante le esposizioni, per determinare in modo adeguato l'uniformità della distribuzione delle particelle a cui gli animali sono stati esposti.

Durata dello studio

La durata del periodo di somministrazione dovrebbe essere di almeno 12 mesi.

Procedimento

Osservazioni

Un accurato esame clinico dovrebbe essere eseguito almeno quotidianamente. Oltre alle osservazioni supplementari, si dovrebbero adottare le misure appropriate per ridurre al massimo la perdita di animali, ad esempio necroscopia o refrigerazione degli animali trovati morti e isolamento o sacrificio degli animali deboli o moribondi. Si dovrebbero eseguire accurate osservazioni per individuare l'insorgere e la progressione di tutti gli effetti tossici e per ridurre al massimo le perdite dovute a malattia, ad autolisi, o a cannibalismo.

I segni clinici, comprese le alterazioni oculari e neurologiche nonché la mortalità, dovrebbero essere registrati per tutti gli animali. Si dovrebbero registrare il tempo di insorgenza e la progressione delle condizioni tossiche, compresi i tumori sospetti.

Una registrazione individuale del peso corporeo di tutti gli animali dovrebbe essere effettuata una volta per settimana, durante le prime 13 settimane del periodo di saggio ed almeno una volta ogni 4 settimane in seguito. La quantità di cibo ingerita dovrebbe essere determinata settimanalmente durante le prime 13 settimane dello studio, e poi a intervalli di circa tre mesi, a meno che lo stato di salute o le variazioni del peso corporeo non impongano altre soluzioni.

Esame ematologico

L'esame ematologico (ad esempio: contenuto di emoglobina, volume delle cellule ammassate, eritrociti totali, leucociti totali, piastrine, o altre misure di potenziale di coagulazione) dovrebbe essere eseguito dopo 3 mesi, 6 mesi e quindi a intervalli di circa 6 mesi, ed alla conclusione dello studio, su campioni di sangue raccolti da tutti i non-roditori e da 10 ratti per sesso di tutti i gruppi. Se possibile, questi prelievi dovrebbero essere effettuati ogni volta sugli stessi ratti. Inoltre, si dovrebbe raccogliere un campione prima dell'esperimento dai non-roditori.

Se le osservazioni cliniche indicano un deterioramento nella salute degli animali durante lo studio, si dovrebbe eseguire un conteggio differenziale ematico dei suddetti animali.

Un conteggio differenziale ematico viene eseguito sui campioni provenienti dagli animali del gruppo a dosaggio più elevato e dai controlli. I conteggi differenziali ematici sono eseguiti per il gruppo seguente (o i gruppi seguenti) trattato con dosaggio inferiore, soltanto se vi sono discordanze importanti tra il gruppo trattato con dosaggio più elevato ed i controlli, o se vi sono indicazioni derivanti dai risultati dall'esame patologico.

Analisi delle urine

Per l'analisi si dovrebbero prelevare campioni di urina da tutti i non-roditori e da 10 ratti per sesso di tutti i gruppi, se possibile dagli stessi ratti ed agli stessi intervalli dell'esame ematologico. Le seguenti determinazioni dovrebbero essere effettuate o sui singoli animali o su una miscela dei campioni per sesso e per gruppo di roditori:

— aspetto: volume e densità per i singoli animali;

— proteine, glucosio, chetoni, sangue occulto (semiquantitativamente);

— microscopia del sedimento (semiquantitativamente).

Chimica clinica

Approssimativamente a intervalli di 6 mesi, ed alla conclusione del saggio, si prelevano campioni di sangue per le determinazioni di chimica clinica da tutti i non-roditori e da 10 ratti/sesso di tutti i gruppi, se possibile dagli stessi ratti a ogni intervallo. Inoltre si dovrebbe prelevare un campione prima dell'esperimento dai non-roditori. Da questo campioni viene preparato il plasma e vengono eseguite le seguenti analisi:

— concentrazione delle proteine totali;

— concentrazione dell'albumina;

— saggo di funzionalità epatica (quali attività fosfatasi alcalina, glutammico-piruvico transaminasi [1] e transminasi glutammico-ossalacetica [2], glutammil transpeptidasi, ornitina decarbossilasi);

— metabolismo dei caboidrati, quali glucosio ematico a digiuno;

— saggi di funzionalità renale, quali azoto ureico ematico.

Necroscopia macroscopica

È necessario un esame necroscopico completo di tutti gli animali, compresi quelli morti durante l'esperimento o uccisi perché moribondi. Prima del sacrificio da tutti gli animali si dovrebbero prelevare campioni di sangue per i conteggi differenziali ematici. Tutte le lesioni macroscopiche visibili, i tumori o le lesioni sospette quali tumori dovrebbero essere conservate. Si dovrebbe cercare di correlare le osservazioni macroscopiche con i risultati degli esami microscopici.

Tutti gli organi e i tessuti dovrebbero essere conservati per l'esame istopatologico. Questo di solito riguarda i seguenti organi e tessuti: cervello [3] (midollo/ponte, corteccia cerebellare, corteccia cerebrale), pituitaria, tiroide (compresa paratiroide), timo, polmoni (trachea compresa), cuore, aorta, ghiandole salivarie, fegato [3], milza, reni [3], ghiandole surrenali [3], esofago, stomaco, duodeno, digiuno, ileo, intestino cieco, colon, retto, utero, vescica urinaria, linfonodi, pancreas, gonadi [3], organi genitali accessori, ghiandole mammarie femminili, pelle, muscolatura, nervo periferico, midollo spinale (cervicale, toracico, lombare), sterno con midollo osseo e femore (articolazione compresa) e occhi. L'insufflazione dei polmoni e della vescica urinaria con un fissativo è il modo ottimale di conservare questi tessuti; l'insufflazione dei polmoni negli studi di inalazione è essenziale per eseguire un esame istopatologico appropriato. Negli studi speciali, quali quelli di inalazione, si studieranno l'intero tratto respiratorio compreso naso, faringe e laringe.

Se si eseguono altri esami clinici, le informazioni ottenute da questi dovranno essere disponibili prima dell'esame microscopico, perché esse possono fornire indicazioni significative al patologo.

Istopatologia

Tutte le alterazioni visibili, in particolare i tumori ed altre lesioni che si verificano in qualsiasi organo, dovrebbero essere esaminati microscopicamente. Inoltre si raccomandano le seguenti procedure:

a) esame microscopico di tutti gli organi e tessuti conservati, con descrizione completa di tutte le lesioni riscontrate in:

   1. tutti gli animali che sono morti durante lo studio, e

   2. tutti quelli dei gruppi trattati con la dose elevata e controlli. Questi organi, prelevati da 10 animali per sesso e per gruppo per i roditori e da tutti i non-roditori, più tiroide (con paratiroide) per tutti i non-roditori, dovrebbero essere pesati;

b) gli organi o i tessuti che mostrano anomalie causate, o possibilmente causate dalla sostanza in esame, vengono esaminati anche negli animali appartenenti ai gruppi trattati con le dosi più basse;

c) se il risultato dell'esperimento evidenzia una riduzione sostanziale della longevità normale degli animali o induzione di effetti in grado di influire sulla risposta tossica, gli animali del gruppo trattato con livello di dose immediatamente inferiore dovrebbero essere esaminati come sopra descritto;

d) informazioni sull'incidenza di lesioni normalmente riscontrate nel ceppo degli animali usati, nelle stesse condizioni di laboratorio ossia i dati storici dei controlli sono indispensabili per valutare correttamente l'importanza dei mutamenti osservati negli animali trattati.

---

(1) Ora nota come alanino-amminotransferasi serica.

(2) Ora nota come aspartato-amminotransferasi serica.

(3) Questi organi, prelevati da 10 animali per sesso e per gruppo per i roditori e da tutti i non-roditori, più tiroide (con paratiroide) per tutti i non-roditori, dovrebbero essere pesati.

2. DATI

I dati dovrebbero essere riassunti sotto forma di tabelle, indicando per ogni gruppo di saggio il numero di animali all'inizio del saggio, il numero degli animali che presenta lesioni e la percentuale degli animali che presenta ciascun tipo di lesione. I risultati dovrebbero essere valutati con un metodo statistico idoneo. Qualsiasi metodo statistico riconosciuto può essere utilizzato.

3. RELAZIONE

3.1. Relazione sul saggio

Nella relazione sul saggio devono figurare, se possibile:

— specie, ceppo, origine, condizioni ambientali, dieta;

— *condizioni sperimentali:*

descrizione dell'apparecchiatura per l'esposizione, inclusi: progettazione, tipo, dimensioni, fonte dell'aria, sistema per generare particelle e aerosol, metodo di condizionamento dell'aria, trattamento dell'aria di scarico e metodo di alloggiamento degli animali in una camera di saggio, quando questa è utilizzata. L'attrezzatura per misurare la temperatura, l'umidità e, se del caso, la stabilità di concentrazione degli aerosol o la dimensione delle particelle dovrebbe essere descritta;

dati di esposizione: dovrebbero essere presentati in forma tabulare con i valori medi e una misura della variabilità (per esempio: deviazione standard) e dovrebbero includere:

a) portate dell'aria attraverso l'attrezzatura di inalazione,

b) temperatura ed umidità dell'aria,

c) concentrazioni nominali (quantità totale della sostanza in esame immessa nell'attrezzatura di inalazione divisa per il volume dell'aria),

d) natura del veicolo, se usato,

e) concentrazioni reali nella zona sperimentale di respirazione,

f) dimensioni delle particelle mediane (se del caso);

— livelli di dose (incluso il veicolo, se usato) e le concentrazioni;

— dati relativi agli effetti tossici per sesso e dose;

— livello senza effetti;

— tempo di eventi letali durante lo studio o se gli animali erano vivi al completamento del saggio;

— descrizione degli effetti tossici e di altri effetti;

— registrazione della data di osservazione di ogni sintomo anomalo e successivo decorso;

— dati di alimentazione e di peso corporeo;

— risultati oftalmologici;

— prove ematologiche usate e risultati completi;

— saggi di biochimica clinica usati e risultati completi (compresi i risultati dell'analisi delle urine);

— risultati della necroscopia;

— descrizione particolareggiata di tutti i risultati istopatologici;

— elaborazione statistica dei risultati, quando possibile;

— discussione dei risultati;

— interpretazione dei risultati.

3.2. Valutazione ed interpretazione

Vedi introduzione generale, parte B.

RIFERIMENTI

Vedi introduzione generale, parte B.

SAGGIO DI CANCEROGENESI

1. METODO

1.1. Introduzione

Vedi introduzione generale, parte B.

1.2. Definizioni

Vedi introduzione generale, parte B.

1.3. Sostanze di riferimento

Nessuna.

1.4. Principio del metodo di saggio

La sostanza da saggiare è somministrata normalmente 7 giorni per settimana, tramite via appropriata, a diversi gruppi di animali sperimentali, una dose per gruppo, per la maggior parte della loro durata di vita. Durante e dopo l'esposizione alla sostanza, gli animali verranno sottoposti giornalmente ad osservazione per individuare i sintomi della tossicità, in particolare lo sviluppo dei tumori.

1.5. Criteri qualitativi

Nessuno.

1.6. Descrizione del metodo di saggio

Preparazioni

Gli animali sono tenuti nell'allogio sperimentale e nutriti per almeno 5 giorni prima dell'inizio della prova. Prima dell'esperimento, gli animali giovani e sani vengono randomizzati ed assegnati a gruppi stabiliti.

Animali da laboratorio

La specie preferita è il ratto. Sulla base dei risultati di studi precedentemente intrapresi, altre specie (roditori o non-roditori) possono essere utilizzate. Sarà opportuno usare ceppi di giovani animali sani generalmente utilizzati in laboratorio e il dosaggio dovrà iniziare non appena possibile dopo lo svezzamento. All'inizio dello studio, la variazione di peso degli animali usati non dovrà superare più o meno 20 % del valore medio. Quando vengano intrapresi studi di subcronicità orale come preliminari ad uno studio a lungo termine, si dovranno usare le stesse specie in entrambi gli studi.

Numero e sesso

Si utilizzeranno animali di entrambi i sessi.

La somministrazione del dosaggio ai roditori dovrà cominiciare non appena possibile dopo lo svezzamento.

Nel caso di roditori si utilizzeranno almeno 100 animali (50 maschi e 50 femmine) per ogni livello di dose e gruppo di controllo parallelo. Le femmine devono essere nullipare e non gravide. Se si prevede di sacrificare ad intervalli alcuni animali, il numero dovrà essere aumentato del numero di animali che si prevede di sacrificare prima del completamento dello studio.

Livelli di dose e frequenza dell'esposizione

Si dovranno usare almeno tre livelli di dose oltre a un gruppo di controllo parallelo. Il livello di dose più elevato dovrà essere tale da provocare sintomi di tossicità minimi, quali una leggera diminuzione dell'aumento del peso corporeo (meno di 10 %), senza alterare sostanzialmente la durata normale di vita per effetti diversi da quelli dei tumori.

La dose più bassa non dovrà interferire con la crescita, lo sviluppo, e la longevità normali dell'animale né produrre sintomi di tossicità. In generale, essa non dovrà essere inferiore al 10 % della dose più elevata.

La (le) dose(i) intermedia(e) dovrà essere stabilita mediamente tra le dosi elevate e quelle basse.

La scelta dei livelli di dose dovrà prendere in considerazione i dati delle prove e degli studi precedenti di tossicità.

Se il prodotto chimico è somministrato in acqua potabile o mescolato nella dieta, esso dovrà essere continuamente disponibile.

Controlli

Si userà il gruppo di controllo parallelo, che è identico sotto ogni aspetto ai gruppi esposti eccezion fatta per l'esposizione alla sostanza in esame.

In circostanze specifiche, quali ad esempio gli studi di inalazione comportanti impiego di aerosol o gli studi sulla tossicità orale che contemplano l'uso di un emulsionante ad attività biologica atipica, si utilizzerà un gruppo di controllo supplementare non esposto al veicolo.

Vie di somministrazione

Le tre vie principali di somministrazione sono: orale, cutanea e per inalazione. La scelta della via di somministrazione dipende dalle caratteristiche fisiche e chimiche della sostanza da saggiare e dalla via che caratterizza l'esposizione degli esseri umani.

Saggio per via orale

Se la sostanza da saggiare è assorbita dal tratto gastrointestinale, e se la via orale è una via di esposizione degli esseri umani, verrà preferita la via orale di somministrazione, a meno che non vi siano controindicazioni. Gli animali dovranno ricevere la sostanza da saggiare nella loro dieta, sciolta in acqua potabile, o in capsula.

Il dosaggio ideale dovrebbe essere un dosaggio quotidiano sulla base di sette giorni/settimana, perché il dosaggio di cinque giorni/settimana permette il recupero o la perdita di tossicità nel periodo di mancato dosaggio, influenzando così i risultati e la valutazione successiva. Tuttavia, principalmente sulla base di considerazioni pratiche, il dosaggio di cinque giorni/settimana è considerato accettabile.

Saggio per via cutanea

L'esposizione cutanea per spennellamento della pelle può essere scelta per simulare una via principale di esposizione umana e come sistema modello per induzione di lesioni cutanee.

Saggio per via inalatoria

Poiché gli esperimenti di inalazione presentano problemi tecnici di maggior complessità delle altre vie di somministrazione, si forniscono in questa sede indicazioni particolareggiate su questo modo di somministrazione. Da notare inoltre che l'installazione endotracheale può costituire un'alternativa valida in situazioni specifiche.

Le esposizioni a lungo termine sono di solito modellate sui tipi di esposizione umana e sottopongono gli animali ad un'esposizione quotidiana di 6 ore dopo livellamento delle concentrazioni della camera, per 5 giorni/settimana (esposizione intermittente) o, per un'esposizione ambientale possibile, con 22-24 ore di esposizione/giorno 7 giorni/settimana (esposizione continua), con circa un'ora per nutrire gli animali in orari simili ogni giorno e per il mantenimento delle camere. In entrambi i casi, gli animali di solito sono esposti ad una concentrazione fissa di sostanza da saggiare. Una differenza notevole da considerare tra l'esposizione intermittente e quella continua è costituita dal fatto che con la prima vi è un periodo di 17-18 ore in cui gli animali possono riprendersi dagli effetti di ogni esposizione, e un periodo ancora più lungo di recupero a fine settimana.

La scelta dell'esposizione intermittente o continua dipende dagli obiettivi dello studio e dall'esposizione umana da simulare. Tuttavia, occorrerà considerare alcune difficoltà tecniche. Per esempio, i vantaggi dell'esposizione continua per la simulazione delle condizioni ambientali possono essere compensati dalla necessità di abbeverare e nutrire gli animali durante l'esposizione, e dall'esigenza di usare aerosol più complicati (e affidabili), di generare il vapore e di usare tecniche di controllo.

Camere di esposizione

Gli animali dovranno essere sottoposti a prove in camere di inalazione progettate per sostenere un flusso dinamico di almeno 12 cambiamenti d'aria/ora, per assicurare un tenore di ossigeno adeguato e un'atmosfera ugualmente distribuita. Le camere di esposizione e di controllo dovranno avere costruzioni e progettazioni identiche per assicurare condizioni di esposizione comparabili sotto tutti gli aspetti, eccezion fatta per le esposizioni alle sostanze

da saggiare. Una leggera pressione negativa dentro la camera viene generalmente mantenuta per impedire perdite della sostanza sperimentale nella zona circostante. Nelle camere si dovrà ridurre al massimo l'affollamento degli animali sperimentali. Come regola generale per assicurare la stabilità dell'atmosfera della camera, il «volume» totale degli animali sperimentali non dovrà superare il 5 % del volume della camera.

Si effettueranno le seguenti misurazioni o controlli:

i) Corrente d'aria: la portata d'aria attraverso la camera dovrà essere controllata preferibilmente in continuo.

ii) Concentrazione: durante il periodo di esposizione quotidiana, la concentrazione non dovrà variare di più del ± 15 % dal valore medio. Per la durata totale dello studio, le concentrazioni giornaliere dovranno essere tenute costanti nella misura del possibile.

iii) Temperatura ed umidità: per i roditori, la temperatura dovrà essere mantenuta a 22 °C (± 2 °C) e l'umidità all'interno della camera al 30-70 %, eccetto quando l'acqua è usata per mantenere in sospensione la sostanza sperimentale nell'atmosfera della camera. Entrambe dovranno essere controllate preferibilmente in continuo.

iv) Misurazioni delle dimensioni delle particelle: occorrerà effettuare una determinazione della distribuzione dimensionale delle particelle nell'atmosfera delle camere in cui si usino aerosol liquidi o solidi. Le particelle degli aerosol dovranno essere di dimensioni respirabili per gli animali sperimentali usati. I campioni delle atmosfere della camera saranno prelevati nell'area di respirazione degli animali. Il campione dell'aria sarà rappresentativo della distribuzione delle particelle a cui gli animali sono esposti e dovrà rappresentare, su una base gravimetrica, tutto l'aerosol sospeso anche quando gran parte dello stesso non è respirabile. Le analisi granulometriche dovranno essere effettuate di frequente durante la messa a punto del sistema di generazione per assicurare la stabilità dell'aerosol e, in seguito, durante le esposizioni, solo quando necessario, a seconda dei bisogni, per determinare l'uniformità di distribuzione delle particelle a cui gli animali sono stati esposti.

Durata dello studio

La durata di un test di cancerogenesi copre la parte principale della durata normale di vita degli animali sperimentali. La conclusione dello studio sarà dopo 18 mesi per i topi ed i criceti, e dopo 24 mesi per i ratti; tuttavia, per certi ceppi di animali con maggior longevità e tasso poco elevato di tumori spontanei, la conclusione dovrebbe essere dopo 24 mesi per i topi ed i criceti e dopo 30 mesi per i ratti. Alternativamente, la conclusione di un tale studio esteso è accettabile quando la percentuale di superstiti nel gruppo a livello di dose più basso o nel gruppo di controllo raggiunge il 25 %. Allo scopo di terminare lo studio in cui si manifesti una differenza evidente nella risposta, determinata dal sesso, ciascun sesso dovrà essere considerato come un esperimento distinto. Quando solo il gruppo a dose elevata muore prematuramente per ovvie ragioni di tossicità, questa ragione non deve determinare la conclusione dell'esperimento a meno che le manifestazioni tossiche non causino problemi negli altri gruppi. Perché un risultato sperimentale negativo sia accettabile, non più del 10 % di animali di qualsiasi gruppo deve essere perso a causa di autolisi, cannibalismo o altri problemi, e il tasso di sopravvivenza di tutti i gruppi non deve essere inferiore al 50 % a 18 mesi per i topi ed i criceti e a 24 mesi per i ratti.

Procedimento

Osservazioni

Le osservazioni parallele includeranno modificazioni della cute e del pelo, degli occhi e delle mucose nonché del sistema nervoso centrale ed autonomo, di quello respiratorio e circolatorio, dell'attività somatomotoria e del modello comportamentale.

L'osservazione regolare degli animali è necessaria per assicurarsi che gli stessi siano conservati il più possibile per lo studio e non persi a causa di cannibalismo, autolisi dei tessuti o smarrimento. Gli animali moribondi verranno rimossi e sottoposti a necroscopia.

Per tutti gli animali si annoteranno i sintomi clinici e la mortalità. Si dedicherà speciale attenzione all'insorgenza dei tumori; si registrerà la data di inizio, la posizione, le dimensioni, l'aspetto e la progressione di ogni tumore grossolanamente visibile o palpabile.

Si procederà settimanalmente alla misurazione del consumo alimentare (e del consumo dell'acqua quando la sostanza sperimentale è somministrata in acqua potabile) durante le prime 13 settimane dello studio e successivamente a intervalli di circa tre mesi a meno che i cambiamenti dello stato di salute o del peso corporeo non impongano altre soluzioni.

Il peso corporeo dovrà essere registrato individualmente per tutti gli animali una volta per settimana durante le prime 13 settimane del periodo di prova ed almeno una volta ogni 4 settimane in seguito.

Esami clinici

Ematologia

Se le osservazioni parallele evidenziano un deterioramento nella salute degli animali durante lo studio, si eseguirà un conteggio differenziale del sangue degli animali colpiti.

Dopo 12 mesi, 18 mesi e prima del sacrificio, si farà uno striscio del sangue di tutti gli animali. Un conteggio differenziale del sangue sarà eseguito sui campioni ottenuti dagli animali nel gruppo a dosaggio più elevato e nei controlli. Se i suddetti dati, e in particolare quelli ottenuti prima del sacrificio, o i dati dall'esame patologico ne indicano l'esigenza, si eseguirà il conteggio differenziale del sangue anche per il gruppo(i) trattato con dosaggio *immediatamente inferiore*.

Esame autoptico di base

L'esame autoptico di base completo dovrà essere eseguito su tutti gli animali, compresi quelli che sono morti durante l'esperimento e quelli moribondi. Si conserveranno tutti i tumori o le lesioni visibili o sospette.

I seguenti organi e tessuti dovranno essere conservati in mezzo adatto per esami istopatologici futuri possibili: tutte le lesioni generali, cervello — comprese sezioni di midollo/ponte, corteccia cerebellare e corteccia cerebrale, pituitaria, tiroide/paratiroide, qualsiasi tessuto timico, trachea e polmoni, cuore, aorta, ghiandole salivari, milza, fegato, reni, ghiandole surrenali, pancreas, gonadi, utero; organi genitali accessori, pelle, esofago, stomaco, duodeno, digiuno, ileo, intestino cieco, colon, retto, vescica urinaria, linfonodi rappresentativi, ghiandole mammarie femminili, muscolatura della coscia, nervo periferico, sterno con midollo osseo, femore — compresa superficie articolare, midollo spinale a tre livelli — cervicale, mediotoracico e lombare, occhi e ghiandole lacrimali esorbitali.

Sebbene l'insufflazione dei polmoni e della vescica urinaria con un fissativo sia il modo ottimale di conservare questi tessuti, l'insufflazione dei polmoni negli studi di inalazione è un requisito necessario per l'esecuzione dell'esame istopatologico appropriato. Negli studi di inalazione, si conserverà tutto il tratto respiratorio, comprese le cavità nasali, le faringi e le laringi.

Esame istopatologico

a) Esame istopatologico completo degli organi e dei tessuti di tutti gli animali che muoiono o vengono sacrificati durante la prova e di tutti gli animali nei gruppi trattati con dose elevata e nei controlli.

b) Esame dei tumori o lesioni grossolane visibili o sospette in tutti i gruppi.

c) Se nei gruppi trattati con dosaggio elevato e nei gruppi di controllo si riscontra una differenza significativa nell'incidenza di lesioni neoplastiche, si eseguirà l'esame istopatologico di quell'organo o tessuto specifico negli altri gruppi.

d) Se il tasso di sopravvivenza nel gruppo trattato con dosi elevate è significativamente inferiore a quello del gruppo di controllo, il gruppo trattato con dosaggio immediatamente inferiore dovrà essere sottoposto ad esame completo.

e) Se nel gruppo trattato con dosi elevate si riscontra induzione di tossicità o altri effetti che potrebbero influire sulla risposta neoplastica, si effettuerà un esame completo del gruppo trattato con il dosaggio immediatamente inferiore.

2. DATI

I dati dovranno essere riassunti sotto forma di tabella, indicando per ogni gruppo sperimentale il numero di animali all'inizio della prova, il numero di animali che presentano tumori scoperti durante l'esperimento, la data di individuazione ed il numero di animali in cui si sono riscontrati tumori dopo l'uccisione. I risultati debbono essere valutati con un metodo statistico idoneo. Qualsiasi metodo statistico riconosciuto può essere utilizzato.

3. RELAZIONE

3.1 Relazione sul saggio

Nella relazione sul saggio devono figurare, se possibile:

— specie, ceppo, origine, condizioni ambientali, dieta, ecc.,

— condizioni sperimentali

descrizione dell'apparecchiatura di esposizione, includente:

progettazione, tipo, dimensioni, fonte di aria, sistema per generare particelle ed aerosol, metodo di condizionamento dell'aria, trattamento dell'aria di scarico, metodo di alloggiamento degli animali in una camera sperimentale quando questo sistema venga utilizzato. Descrizione del dispositivo per misurare la temperatura, l'umidità e, se del caso, la stabilità delle concentrazioni di aerosol o le dimensioni delle particelle.

Dati di esposizione: questi dovranno essere presentati in forma di tabelle con indicazione dei valori medi e una misura della variabilità (ad esempio: deviazione standard) e includeranno:

a) portata dell'aria attraverso l'attrezzatura di inalazione,

b) temperatura ed umidità dell'aria,

c) concentrazioni nominali (quantità totale della sostanza sperimentale immessa nell'attrezzatura di inalazione divisa per il volume dell'aria),

d) natura del veicolo, se usato,

e) concentrazioni reali nella zona sperimentale di respirazione,

f) dimensioni delle particelle mediane (se del caso):

— livelli di dose (veicolo compreso, se utilizzato) e concentrazioni;

— dati di incidenza del tumore secondo il sesso, la dose e il tipo di tumore;

— registrazione della data della morte (durante l'esperimento) oppure specificare se gli animali sono sopravvissuti fino alla conclusione della prova;

— dati sulla risposta tossica per sesso e per dose;

— descrizione degli effetti tossici o di altri effetti;

— registrazione della data di osservazione di ogni sintomo anomalo e del decorso successivo;

— alimentazione e dati sul peso corporeo;

— risultati dell'esame ematologico;

— risultati dell'autopsia;

— descrizione particolareggiata di tutti i risultati istopatologici;

— elaborazione statistica dei risultati con descrizione dei metodi impiegati;

— discussione dei risultati;

— interpretazione dei risultati.

3.2. Valutazione ed interpretazione

Vedi introduzione generale, parte B.

4. RIFERIMENTI

Vedi introduzione generale, parte B.

SAGGIO COMBINATO DI TOSSICITÀ CRONICA / CANCEROGENESI

1. METODO

1.1. Introduzione

Vedi introduzione generale, parte B.

1.2. Definizioni

Vedi introduzione generale, parte B.

1.3. Sostanze di riferimento

Nessuna.

1.4. Principio del metodo di saggio

L'obiettivo di un saggio combinato di tossicità cronica/cancerogenesi è quello di determinare gli effetti cronici e cancerogeni di una sostanza di una specie di mammifero in seguito a esposizione prolungata.

Per questo scopo, uno studio di cancerogenesi è integrato con almeno un gruppo satellite trattato e un gruppo satellite di controllo. La dose usata per il gruppo satellite a dose elevata può essere più alta di quella usata per il gruppo a dose elevata nello studio di cancerogenesi. Nello studio di cancerogenesi, gli animali sono esaminati per la tossicità in generale come pure per la risposta cancerogena. Gli animali nel gruppo satellite trattato sono esaminati per la tossicità in generale.

La sostanza in esame è somministrata normalmente 7 giorni per settimana, per una via di somministrazione appropriata, a diversi gruppi di animali da esperimento, una dose per gruppo, per la maggior parte della loro vita. Durante e dopo l'esposizione alla sostanza in esame, gli animali da esperimento vengono osservati ogni giorno per individuare i segni di tossicità e lo sviluppo di tumori.

1.5. Criteri qualitativi

Nessuno.

1.6. Descrizione del metodo di saggio

Gli animali sono tenuti nelle condizioni di alloggio e di alimentazione del saggio per almeno 5 giorni prima dell'inizio della prova. Prima dell'esperimento, gli animali giovani e sani vengono mescolati con metodo casuale ed assegnati a gruppi.

Animali da esperimento

La specie preferita è il ratto. Sulla base dei risultati di studi precedentemente svolti, altre specie (roditori o non-roditori) possono essere utilizzate. Si dovrebbero usare i ceppi di animali giovani sani generalmente usati in laboratorio e il dosaggio dovrebbe cominciare non appena possibile dopo lo svezzamento.

All'inizio dello studio, la variazione del peso degli animali usati non dovrebbe superare il ± 20 % del valore medio. Quando venga intrapreso uno studio subcronico orale come preliminare ad uno studio a lungo termine, si dovrebbe usare la stessa specie e lo stesso ceppo in entrambi gli studi.

Numero e sesso

Per i roditori si dovrebbero usare almeno 100 animali (50 maschi e 50 femmine) per ciascun livello di dose e un gruppo di controllo parallelo. Le femmine dovranno essere nullipare e non gravide. Se si prevedono sacrifici intermedi, il numero dovrebbe essere aumentato del numero di animali che si prevede di sacrificare prima del completamento dello studio.

Il(i) gruppo(i) satellite(i) trattato(i) per la valutazione di patologie diverse dai tumori dovrebbe essere composto da 20 animali di ciascun sesso, mentre il gruppo di controllo satellite dovrà contenere 10 animali di ciascun sesso.

Livelli di dose e frequenza di esposizione

Per gli scopi delle prove di cancerogenesi si dovrebbero usare almeno tre livelli di dose oltre ad un gruppo di controllo parallelo. Il livello di dose più elevato dovrebbe produrre sintomi minimi di tossicità, quale un leggero calo dell'aumento del peso corporeo (meno del 10%), senza alterare sostanzialmente la durata normale di vita a causa di effetti diversi dai tumori.

Il livello di dose più basso non dovrebbe interferire con la crescita normale, lo sviluppo e la longevità dell'animale, né produrre alcuna indicazione di tossicità. Questa dose, in genere, non dovrebbe essere inferiore al 10% della dose elevata. La(e) dose(i) intermedia(e) dovrebbe(ro) essere fissata(e) in un intervallo medio compreso fra la dose elevata a quella bassa. La selezione dei livelli di dose dovrebbe tener conto dei dati derivati dai saggi e dagli studi di tossicità precedenti. Per le finalità del saggio di tossicità cronica, nel saggio vengono inclusi gruppi trattati aggiuntivi e un gruppo di controllo satellite parallelo. La dose elevata per il trattamento degli animali del gruppo satellite dovrà essere tale da produrre evidenti segni di tossicità.

La frequenza dell'esposizione è normalmente quotidiana. Se la sostanza chimica è somministrata nell'acqua da bere o mescolata nella dieta, queste dovrebbero essere continuamente disponibili.

Controlli

Si dovrebbe usare un gruppo parallelo, identico sotto tutti gli aspetti ai gruppi trattati, fatta eccezione per l'esposizione alla sostanza in esame.

In circostanze speciali, quali gli studi di inalazione comportanti l'uso di aerosol o di un emulsionante con attività biologica non caratterizzata mediante studi di tossicità orale, si dovrebbe utilizzare un gruppo di controllo complementare non esposto al veicolo.

Vie di somministrazione

Le tre vie principali di somministrazione sono: orale, cutanea e per inalazione. La scelta della via di somministrazione è funzione delle caratteristiche chimico-fisiche della sostanza in esame e della più probabile via di esposizione degli esseri umani.

Saggi per via orale

Quando la sostanza in esame è assorbita dal tratto gastrointestinale e l'ingestione è una via di esposizione per gli esseri umani, si preferisce la via orale di somministrazione a meno che vi siano controindicazioni. Gli animali possono ricevere la sostanza in esame nella loro dieta, sciolta nell'acqua potabile, o somministrata in capsula.

Idealmente, si dovrebbe usare un dosaggio quotidiano sulla base di sette giorni per settimana, perché il dosaggio di cinque giorni per settimana potrebbe permettere il recupero o una tossicità da privazione nel periodo di mancato dosaggio influenzando così i risultati e la valutazione successiva. Tuttavia, principalmente sulla base di considerazioni pratiche, un dosaggio sulla base di cinque giorni per settimana è considerato accettabile.

Saggi per via cutanea

L'esposizione cutanea con spennellatura della pelle può essere scelta per simulare una principale via di esposizione umana e come sistema modello per induzione di lesioni cutanee.

Saggi per via inalatoria

Poiché i saggi inalatori presentano problemi tecnici di maggior complessità delle altre vie di somministrazione, si forniscono in questa sede indicazioni più particolareggiate su questo modo di somministrazione. Da notare inoltre che l'instillazione endotracheale può costituire un'alternativa valida in situazioni specifiche.

Le esposizioni a lungo termine sono di solito modellate su esposizione umana prevista sottoponendo gli animali ad un esposizione quotidiana di 6 ore dopo equilibrazione delle concentrazioni della camera, per 5 giorni/settimana (esposizione intermittente) o ad un'esposizione ambientale possibile, con 22-24 ore di esposizione/giorno, 7 giorni per settimana (esposizione continua), con circa un'ora per nutrire gli animali allo stesso orario e per la manutenzione della camera. In entrambi i casi, gli animali di solito sono esposti a concentrazioni fisse delle sostanze in esame. Una differenza notevole da considerare tra l'esposizione intermittente e quella continua è costituita dal fatto che con la prima vi è un periodo di 17-18 ore in cui gli animali possono riprendersi dagli effetti di ogni esposizione quotidiana, e un periodo ancora più lungo di ricupero durante i fine settimana.

La scelta dell'esposizione intermittente o continua dipende dagli obiettivi dello studio e dall'esposizione umana da simulare. Tuttavia, occorrerà considerare alcune difficoltà tecniche. Per esempio, i vantaggi dell'esposizione continua per la simulazione delle condizioni ambientali possono essere controbilanciati dalla necessità di abbeverare o nutrire gli animali durante l'esposizione, e dall'esigenza di usare aerosol più complicati (e affidabili) e di sistemi di generazione del vapore e di controllo.

Camere di esposizione

Gli animali dovrebbero essere sottoposti a sperimentazione in camere di inalazione progettate per sostenere un flusso dinamico di almeno 12 cambiamenti d'aria/ora, per assicurare un tenore di ossigeno adeguato e un'atmosfera di esposizione uniforme. Le camere di esposizione e di controllo dovrebbero essere identiche nella costruzione e progettazione per assicurare condizioni di esposizione comparabili sotto tutti gli aspetti, eccezion fatta per le esposizioni alle sostanze in esame. Una leggera depressione viene generalmente mantenuta dentro la camera per impedire perdite della sostanza in esame nella zona circostante. Nelle camere si dovrebbe ridurre al massimo l'affollamento degli animali di saggio. Come regola generale per assicurare la stabilità dell'atmosfera della camera, il «volume» totale degli animali di saggio non dovrebbe superare il 5 % del volume della camera.

Si dovrebbero effettuare le seguenti misurazioni o controlli:

i) Flusso dell'aria: la velocità del flusso dell'aria attraverso la camera dovrebbe essere controllata preferibilmente in modo continuo.

ii) Concentrazione: durante il periodo di esposizione quotidiana, la concentrazione non dovrebbe variare più del ± 15 % dal valore medio. Per la durata totale dello studio, le concentrazioni giornaliere dovranno essere tenute costanti nella misura del possibile.

iii) Temperatura ed umidità: per i roditori, la temperatura dovrà essere mantenuta a 22 °C (± 2 °C) e l'umidità all'interno della camera al 30-70 %, eccetto quando l'acqua è usata per mantenere in sospensione la sostanza sperimentale nell'atmosfera della camera. Entrambe dovrebbero essere controllate preferibilmente in continuo.

iv) Misura delle dimensioni delle particelle: la distribuzione delle dimensioni delle particelle dovrebbe essere determinata sulle atmosfere di camere che contengono aerosol liquidi o solidi. Le particelle contenute negli aerosol dovrebbero avere dimensioni tali da essere inalabili dall'animale da laboratorio usato. I campioni di atmosfera dovrebbero essere prelevati a livello della zona di respirazione degli animali. Il campione d'aria dovrebbe essere rappresentativo della distribuzione delle particelle a cui gli animali sono esposti e dovrebbe rappresentare, su una base gravimetrica, tutto l'aerosol sospeso anche quando gran parte di esso non è respirabile. Le analisi della grandezza delle particelle dovrebbero essere effettuate spesso durante la messa a punto del sistema di generazione per assicurare la stabilità dell'aerosol e, in seguito, quando si ritenga necessario, durante le esposizioni, per determinare in modo adeguato l'uniformità della distribuzione delle particelle a cui gli animali sono stati esposti.

Durata dello studio

La durata della parte del saggio relativa alla cancerogenesi comprende la maggior parte della vita normale degli animali di saggio. La conclusione del saggio dovrebbe essere a 18 mesi per i topi ed i criceti e dopo 24 mesi per i ratti; tuttavia, per certi ceppi di animali con maggior longevità e/o tasso poco elevato di tumori spontanei, la conclusione dovrebbe essere dopo 24 mesi per i topi ed i criceti e dopo 30 mesi per i ratti. Alternativamente, la conclusione di un tale studio esteso è accettabile quando la percentuale di superstiti nel gruppo a livello di dose più basso o nel gruppo di controllo raggiunge il 25 %. Quando si conclude uno studio in cui si manifesti una differenza evidente nella risposta determinata dal sesso, ciascun sesso dovrebbe essere considerato separatamente. Quando solo il gruppo a dose elevata muore prematuramente per ovvie ragioni di tossicità, ciò non deve necessariamente determinare la conclusione dell'esperimento purché le manifestazioni tossiche non causino problemi negli altri gruppi. Perché un risultato sperimentale negativo sia accettabile, non più del 10 % di animali di qualsiasi gruppo può essere perso nell'esperimento a causa di autolisi, cannibalismo o altri problemi, e il tasso di sopravvivenza di tutti i gruppi non deve essere inferiore al 50 % a 18 mesi per i topi ed i criceti e a 24 mesi per i ratti.

I gruppi satelliti di 20 animali (per sesso) sottoposti a dosaggio e i 10 animali (per sesso) di controllo associati, usati per la prova di tossicità cronica, dovrebbero essere mantenuti ai fini dello studio per almeno 12 mesi. Questi animali dovrebbero essere destinati al sacrificio ai fini di un esame della patologia connessa con la sostanza sperimentale non complicata da mutamenti geriatrici.

Procedimento

Osservazioni

Quotidianamente si dovrebbero effettuare osservazioni cliniche che includeranno i mutamenti della cute e del pelo, degli occhi e delle membrane mucose nonché del sistema nervoso centrale ed autonomo, di quello respiratorio e circolatorio, dell'attività somatomotoria e del modello comportamentale.

Un esame clinico dovrebbe essere effettuato a intervalli appropriati sugli animali del(dei) gruppo(i) satellite(i) trattato(i).

Osservazioni regolari degli animali sono necessarie per assicurarsi, per quanto possibile, che gli stessi non siano persi dallo studio a cause quali cannibalismo, autolisi dei tessuti o smarrimento. Gli animali moribondi dovrebbero essere rimossi e sottoposti a necroscopia.

Per tutti gli animali si dovrebbero registrare i segni clinici, inclusi i mutamenti neurologici ed oculari nonché la mortalità. Si deve dedicare particolare attenzione allo sviluppo dei tumori; il momento di insorgenza e la progressione delle condizioni tossiche dovrebbero essere registrati.

Si dovrebbe procedere settimanalmente alla misurazione del consumo alimentare (e del consumo dell'acqua quando la sostanza in esame è somministrata in tale veicolo) durante le prime 13 settimane dello studio e poi a intervalli di circa tre mesi a meno ché i mutamenti dello stato di salute o del peso corporeo non impongano altre soluzioni.

Il peso corporeo dovrebbe essere registrato individualmente per tutti gli animali una volta per settimana durante le prime 13 settimane del periodo di saggio ed almeno una volta ogni 4 settimane in seguito.

Esami clinici

Ematologia

L'esame ematologico (ad esempio: contenuto dell'emoglobina, volume delle cellule impaccate, globuli rossi totali, globuli bianchi totali, piastrine o altre misure del potenziale di coagulazione) dovrebbe essere eseguito dopo 3 mesi, 6 mesi ed approssimativamente a intervalli successivi di 6 mesi ed alla conclusione, sui campioni di sangue raccolti da 10 ratti per sesso di tutti i gruppi. Se possibile, i campioni dovrebbero essere prelevati dagli stessi ratti a ogni intervallo.

Se le osservazioni cliniche suggeriscono un peggioramento nella salute degli animali durante lo studio, si dovrebbe eseguire un conteggio differenziale ematico degli animali colpiti.

Un conteggio differenziale ematico viene eseguito sui campioni provenienti dagli animali appartenenti ai gruppi a più elevato dosaggio e nei controlli. I conteggi differenziali del sangue sono eseguiti sul gruppo(i) a dosaggio inferiore immediatamente successivo soltanto se si riscontra una discrepanza notevole tra il gruppo a dosaggio più elevato ed i controlli, o se i risultati dell'esame patologico ne indicano l'esigenza.

Analisi delle urine

Si dovrebbero raccogliere per analisi i campioni di urina di 10 ratti per sesso per tutti i gruppi, se possibile agli stessi intervalli dell'esame ematologico. Le seguenti determinazioni dovrebbero essere fatte o a partire dai diversi animali o su un campione miscelato sesso/gruppo per i roditori:

— aspetto: volume e densità per i singoli animali;

— proteina, glucosio, chetoni, sangue occulto (semiquantitativamente);

— microscopia del deposito (semiquantitativamente).

Chimica clinica

Approssimativamente a intervalli di 6 mesi, ed alla conclusione, si prelevano campioni di sangue per le misure di chimica clinica da tutti i non-roditori e da 10 ratti per sesso di tutti i gruppi, se possibile dagli stessi ratti a ogni intervallo. Inoltre, si dovrebbe prelevare un campione prima del saggio dai non-roditori. Il plasma viene preparato da questi campioni e vengono fatte le seguenti determinazioni:

— concentrazione proteina totale;

— concentrazione dell'albumina;

— saggi di funzionalità epatica (come attività fosfatasi alcalina, glutammico-piruvico-transaminasi (¹), glutammico-ossalacetico-transaminasi (²)) gamma-glutamil transpeptidasi, ornitina decarbossilasi;

— metabolismo dei carboidrati, come glucosio ematico a digiuno;

— saggi di funzionalità renale come azoto ureico.

(¹) Ora noto come alanina aminotransferasi serica.

(²) Ora noto come aspartato aminotransferasi serica.

Necroscopia macroscopica

Tutti gli animali dovrebbero essere sottoposti ad esame necroscopico completo, compresi quelli che sono morti durante l'esperimento e quelli sacrificati perché moribondi. Prima del sacrificio si dovrebbero prelevare campioni di sangue da tutti gli animali per i conteggi differenziali ematici. Si dovrebbero conservare tutte le lesioni e i tumori grossolanamente visibili o sospetti. Si dovrebbe cercare di correlare le osservazioni macroscopiche con i risultati microscopici.

Tutti gli organi e i tessuti dovrebbero essere conservati per l'esame istopatologico. Questo di solito riguarda i seguenti organi e tessuti: cervello [1] (midollo/ponte, corteccia cerebellare, corteccia cerebrale), pituitaria, tiroide (compresa paratiroide), timo, polmoni (trachea compresa), cuore, aorta, ghiandole salivari, fegato [1], milza, reni [1] ghiandole surrenali [1], esofago, stomaco, duodeno, digiuno, ileo, intestino cieco, colon, retto, utero, vescica urinaria, linfonodi, pancreas, gonadi [1], organi genitali accessori, ghiandole mammarie femminili, pelle, muscolatura, nervo periferico, midollo spinale (cervicale, toracico, lombare), sterno con midollo osseo e femore (articolazione compresa) e occhi. Sebbene l'insufflazione dei polmoni e della vescica urinaria con un fissativo sia il modo ottimale di conservare questi tessuti, l'insufflazione dei polmoni negli studi di inalazione è un requisito essenziale per l'esame istopatologico appropriato. In studi speciali come quelli dell'inalazione, si dovrebbero studiare tutte le vie respiratorie, compreso naso, faringe e laringe.

Se si eseguono altri esami clinici, le informazioni ottenute con queste procedure dovrebbero essere rese disponibili prima dell'esame microscopico, perché possono fornire indicazioni significative al patologo.

Istopatologia

Per la parte di saggio riguardante la tossicità cronica

Esame particolareggiato da effettuarsi su tutti gli organi conservati di tutti gli animali appartenenti al gruppo satellite trattato con dose elevata e al gruppo di controllo. Quando si riscontra una patologia correlata con la sostanza in esame nel gruppo satellite trattato con dose elevata, gli organi-bersaglio di tutti gli altri animali in un' qualsiasi altro gruppo satellite trattato dovrebbero essere sottoposti ad esame istologico completo e particolareggiato insieme con quelli dei gruppi trattati nella parte di cancerogenesi dello studio alla sua conclusione.

Per la parte di saggio riguardante la cancerogenesi

a) L'esame istopatologico completo dovrebbe essere effettuato sugli organi e tessuti di tutti gli animali che muoiono o che vengono uccisi durante la prova e di tutti gli animali dei gruppi trattati con dose elevata e del gruppo di controllo;

b) tutti i tumori visibili macroscopicamente o le lesioni sospette di essere di origine tumorali, che si riscontrano in qualsiasi organo di tutti i gruppi di animali dovrebbero essere esaminati microscopicamente;

c) se si riscontra una differenza significativa nell'incidenza delle lesioni neoplastiche nei gruppi di controllo e in quello trattato con dose elevata, si dovrebbe effettuare l'esame istopatologico su quel particolare organo o tessuto, negli altri gruppi;

d) se la sopravvivenza nel gruppo trattato con dose elevata è significativamente inferiore a quella del gruppo di controllo, si dovrebbe effettuare un esame completo del gruppo trattato con il dosaggio immediatamente inferiore;

e) quando si riscontra un'evidenza nel gruppo a dosaggio elevato di induzione di effetti tossici o altri effetti che potrebbero influire su una risposta neoplastica, si dovrebbe procedere ad un esame completo del gruppo trattato con il dosaggio immediatamente inferiore.

2. DATI

I dati dovrebbero essere riassunti sotto forma di tabella, indicando per ogni gruppo di saggio il numero di animali all'inizio della prova, il numero di animali che presentano tumori o effetti tossici riscontrati durante il saggio, il tempo di individuazione ed il numero di animali in cui sono stati individuati tumori dopo il sacrificio. I risultati dovrebbero essere valutati con un metodo statistico appropriato. Qualsiasi metodo statistico riconosciuto può essere utilizzato.

3. RELAZIONE

3.1. Relazione sul saggio

Nella relazione sul saggio devono figurare, se possibile:

— specie, ceppo, origine, condizioni ambientali, dieta, ecc.,

[1] Questi organi, provenienti da 10 animali per sesso e per gruppo per i roditori, dovrebbero essere pesati.

— condizioni sperimentali:

descrizione dell'apparecchiatura di esposizione, includente:

progettazione, tipo, dimensioni, sorgente d'aria, sistema per generare particelle ed aerosol, metodo di condizionamento dell'aria, trattamento dell'aria di scarico, metodo di alloggiamento degli animali in una camera di saggio quando questa venga utilizzata. Il dispositivo per misurare la temperatura, l'umidità e, se del caso, la stabilità delle concentrazioni di aerosol o le dimensioni delle particelle.

dati di esposizione:

questi dovranno essere presentati in forma tabulare con indicazione dei valori medi e una misura della variabilità (ad esempio: deviazione standard) ed includere:

a) velocità dei flussi dell'aria attraverso l'attrezzatura di inalazione,

b) temperature ed umidità dell'aria,

c) concentrazioni nominali (quantità totale della sostanza di saggio immessa nell'attrezzatura di inalazione divisa per il volume dell'aria),

d) natura di veicolo, se usato,

e) concentrazioni reali nella zona sperimentale di respirazione,

f) dimensioni mediane delle particelle (se del caso);

— livelli di dose (veicolo compreso, se utilizzato) e concentrazioni;

— dati di incidenza dei tumori secondo il sesso, la dose e il tipo di tumore;

— registrazione del tempo degli eventi letali (durante l'esperimento) oppure specificare se gli animali siano sopravvissuti fino alla conclusione del saggio, incluso gruppo satellite;

— dati sulla risposta tossica per sesso e per dose;

— descrizione degli effetti tossici o di altri effetti;

— registrazione della data di osservazione di ogni sintomo anomalo e del decorso successivo;

— risultati oftalmologici;

— dati su alimentazione e peso corporeo;

— risultati dell'esame ematologico;

— risultati degli esami di biochimica clinica (inclusa qualsiasi analisi delle urine);

— risultati dell'esame necroscopico;

— descrizione particolareggiata di tutti i risultati istopatologici;

— elaborazione statistica dei risultati con descrizione dei metodi impiegati;

— discussione dei risultati;

— interpretazione dei risultati.

3.2. Valutazione ed interpretazione

Vedi introduzione generale, parte B.

4. RIFERIMENTI

Vedi introduzione generale, parte B.

SAGGIO DI TOSSICITÀ SULLA RIPRODUZIONE: UNA GENERAZIONE

1. METODO

1.1. Introduzione

Vedi introduzione generale, parte B.

1.2. Definizioni

Vedi introduzione generale, parte B.

1.3. Sostanza di riferimento

Nessuna.

1.4. Principi del metodo di saggio

La sostanza sperimentale è somministrata in dosi graduate a diversi gruppi di animali maschi e femmine. I maschi dovrebbero essere sottoposti a dosaggio durante la crescita e per almeno un ciclo spermatogenico completo (approssimativamente 56 giorni per il topo e 70 giorni per il ratto) per provocare qualsiasi tipo di effetto avverso da parte della sostanza di saggio sulla spermatogenesi.

Le femmine della generazione P dovrebbero essere sottoposte a dosaggio per almeno due cicli estrali completi per suscitare qualsiasi tipo di effetto contrario della sostanza in esame sull'estro. Gli animali sono poi accoppiati. La sostanza in esame viene somministrata ad entrambi i sessi durante il periodo di accoppiamento ed in seguito soltanto alle femmine durante la gravidanza e per la durata del periodo di allattamento. Per la somministrazione della sostanza in esame per via inalatoria, il metodo richiederà modifiche.

1.5. Criteri qualitativi

Nessuno.

1.6. Descrizione del metodo di saggio

Preparazioni

Prima del saggio gli animali giovani e sani sono mescolati con metodo casuale ed assegnati ai gruppi trattati e di controllo. Gli animali sono tenuti nelle condizioni sperimentali di alloggiamento e nutrizione per almeno 5 giorni prima dell'inizio della prova. Si raccomanda di somministrare la sostanza in esame nella dieta o nell'acqua da bere. Sono accettabili anche altre vie di somministrazione. Il dosaggio per tutti gli animali dovrebbe essere fatto con lo stesso metodo durante l'appropriato periodo dell'esperimento. Se un veicolo od altri additivi sono utilizzati per facilitare il dosaggio, essi non dovranno notoriamente produrre effetti tossici. Il dosaggio dovrà essere fatto su una base di sette giorni per settimana.

Animali da esperimento

Scelta della specie

Il ratto o il topo sono le specie preferite. Si dovrebbero utilizzare animali sani, non sottoposti in precedenza a esperimenti. Non si dovrebbero utilizzare ceppi a bassa fecondità. Gli animali di saggio dovrebbero essere caratterizzati quanto alle specie, al ceppo, al sesso, al peso e all'età.

Per una valutazione adeguata della fertilità, si dovrebbero studiare sia i maschi sia le femmine. Tutti gli animali per il saggio e i controlli dovrebbero essere svezzati prima dell'inizio del dosaggio

Numero e sesso

Ogni gruppo trattato e di controllo dovrebbe contenere un numero sufficiente di animali per avere circa 20 femmine incinte prossime a partorire o quasi al termine della gravidanza.

L'obiettivo è di avere sufficienti gravidanze e figliate per assicurare una valutazione significativa del potenziale della sostanza di influire negativamente sulla fertilità, sulla gravidanza e sul comportamento materno negli animali della generazione P, e sul lattante, sulla crescita e sullo sviluppo della figliata F_1 dal concepimento allo svezzamento.

Condizioni di saggio

Il cibo e l'acqua dovrebbero essere forniti ad libitum. Nell'imminenza del parto, le femmine incinte dovrebbero essere messe in gabbie separate o in gabbie apposite per il parto e possono essere rifornite di materiale per la costruzione della tana.

Livelli di dose

Si dovrebbero usare almeno tre gruppi di trattamento e un gruppo di controllo. Se si usa un veicolo per la somministrazione della sostanza in esame, il gruppo di controllo dovrebbe ricevere il veicolo al livello di dose più alto usato. Se una sostanza in esame provoca una riduzione dell'ingestione o dell'utilizzazione della dieta, si potrebbe considerare necessario l'uso di un gruppo di controllo parallelo. Idealmente, a meno che non sia limitato dalla natura fisico/chimica o dagli effetti biologici della sostanza in esame, il livello di dose più elevato dovrebbe indurre effetti tossici, ma non mortalità nei genitori P. La(e) dose(i) intermedia(e) dovrebbe indurre effetti tossici minimi attribuibili alla sostanza in esame e la dose più bassa non dovrebbe indurre alcun effetto osservabile sui genitori o sulla prole. Quando somministrato con sonda o in capsula, il dosaggio di ogni animale dovrebbe essere basato sul peso corporeo del singolo animale e regolato settimanalmente per tener conto dei cambiamenti del peso corporeo. Per le femmine gravide, i dosaggi possono essere basati sul peso corporeo nel giorno 0 o al 6° giorno di gravidanza.

Saggio limite

Nel caso di sostanze a bassa tossicità, se un livello di dose di almeno 1 000 mg/kg non produce evidenza di interferenza con la funzione riproduttiva, studi con altri livelli di dose possono essere considerati non necessari. Se uno studio preliminare con un livello di dose elevato, con evidenza precisa di tossicità materna, non evidenzia effetti avversi sulla fertilità, studi con altri livelli di dose possono essere considerati non necessari.

Svolgimento del saggio

Programmi sperimentali

Il dosaggio giornaliero dei genitori maschi P dovrebbe cominciare a circa cinque-nove settimane di età, dopo svezzamento e acclimatazione per almeno 5 giorni. Nei ratti, il dosaggio viene continuato per dieci settimane prima del periodo di accoppiamento (per i topi, otto settimane). I maschi dovrebbero essere sacrificati ed esaminati sia alla fine del periodo di accoppiamento oppure, alternativamente, essi possono essere mantenuti con la dieta sperimentale per la possibile produzione di una seconda figliata e dovrebbero essere sacrificati un po' prima della fine dello studio. Per le femmine genitrici P il dosaggio dovrebbe cominciare dopo almeno 5 giorni di acclimatazione e continuare per almeno due settimane prima dell'accoppiamento. Il dosaggio giornaliero delle femmine P dovrebbe continuare durante il periodo di accoppiamento di tre settimane, la gravidanza e fino allo svezzamento della prole F_1. Si dovrebbe dare attenzione a modifiche del programma di dosaggio sulla base di altre informazioni disponibili sulla sostanza in esame, quali l'induzione del suo metabolismo o bioaccumulazione.

Procedura di accoppiamento

Negli studi degli effetti tossici sulla riproduzione si possono usare i seguenti sistemi di accoppiamento: 1:1 (un maschio e una femmina), oppure 1:2 (un maschio e due femmine).

Usando il sistema di accoppiamento 1:1 si dovrebbe mettere una femmina con lo stesso maschio finché la femmina non rimanga gravida o finché non siano trascorse tre settimane. Ogni mattina le femmine dovrebbero essere esaminate per la presenza di sperma o di tappi vaginali. Il giorno 0 di gravidanza è definito come il giorno in cui si trova un tappo vaginale oppure lo sperma.

Le coppie che non riescono ad accoppiarsi dovrebbero essere studiate per determinare la causa della sterilità apparente. Questo può comportare procedure quali, ad esempio, quella di fornire opportunità supplementari di accoppiamento con altri maschi o femmine provati, esame microscopico degli organi riproduttori, e esame del ciclo estrale o della spermatogenesi.

Dimensioni della figliata

Gli animali sottoposti a dosaggio durante lo studio di fertilità vengono lasciati partorire normalmente ed allevare liberamente la prole fino alla fase di svezzamento.

Se si effettua una standardizzazione si suggerisce la seguente procedura. Tra il 1° ed il 4° giorno dopo la nascita, la dimensione di ogni figliata può essere regolata eliminando i piccoli in più, in modo da avere, nella misura del possibile, *quattro maschi e quattro femmine per figliata*.

Ogni volta che il numero di maschi o di femmine non permette di avere quattro animali di ogni sesso per figliata, è accettabile una regolazione parziale (per esempio, cinque maschi e tre femmine). La standardizzazione non è applicabile alle figliate di meno di otto piccoli.

Osservazioni

Durante tutto il periodo di saggio, ogni animale dovrebbe essere sottoposto ad osservazione almeno una volta al giorno. Si dovrebbero registrare tutte le variazioni comportamentali pertinenti, i segni di parto difficile o prolungato, e tutti i sintomi di tossicità, compresa la mortalità. Nei periodi precedenti e durante l'accoppiamento, il consumo alimentare può essere misurato quotidianamente. Dopo il parto e durante l'allattamento, le misurazioni del consumo di alimento (e del consumo dell'acqua quando la sostanza sperimentale è somministrata in acqua potabile) dovrebbero essere effettuate nello stesso giorno della pesatura delle figliate. I maschi e le femmine P dovrebbero essere pesati nel primo giorno del dosaggio e in seguito settimanalmente. Queste osservazioni dovrebbero essere registrate individualmente per ogni animale adulto.

La durata della gestazione dovrebbe essere calcolata dal giorno 0 di gravidanza. Ogni figliata dovrebbe essere esaminata non appena possibile dopo il parto per stabilire il numero ed il sesso dei piccolo, dei nati morti, dei nati vivi e la presenza di grosse anomalie.

I piccolo morti e quelli sacrificati al 4° giorno dovrebbero essere conservati e studiati per la constatazione di possibili difetti.

I piccoli vivi dovrebbero essere contati e le figliate pesate al mattino dopo la nascita, al 4° giorno e al 7° e settimanalmente fino alla conclusione dello studio, quando gli animali dovrebbero essere pesati individualmente. Le anomalie fisiche o comportamentali osservate nei ceppi o nella prole dovrebbero essere registrate.

Patologia

Necroscopia

Al momento del sacrificio o della morte durante lo studio, gli animali della generazione P dovrebbero essere esaminati macroscopicamente per l'individuazione di tutte le anomalie strutturali o mutamenti patologici, prestando particolare attenzione agli organi del sistema riproduttivo. I piccolo morti o moribondi dovrebbero essere esaminati per individuare eventuali difetti.

Istopatologia

Le ovaie, l'utero, il collo dell'utero, la vagina, i testicoli, l'epididimo, le vescichette seminali, la prostata, la ghiandola della coagulazione, la ghiandola pituitaria e l'organo(i)-bersaglio di tutti gli animali P dovrebbero essere conservati per l'esame microscopico. Nel caso in cui questi organi non siano stati esaminati in altri studi con dosi multiple, essi dovrebbero essere esaminati microscopicamente in tutti gli animali dei gruppi trattati con dose elevata e di controllo e negli animali che muoiono durante l'esperimento, quando fattibile.

Gli organi di questi animali che mostrano anomalie dovrebbero quindi essere esaminati in tutti gli altri animali P. In questi casi, si dovrebbe eseguire l'esame microscopico di tutti i tessuti che mostrano alterazioni patologiche macroscopiche. Come suggerito per le procedure di accoppiamento, gli organi riproduttivi degli animali sospetti di sterilità possono essere sottoposti all'esame microscopico.

2. DATI

I dati possono essere riassunti sotto forma di tabella, indicando per ogni gruppo sperimentale il numero di animali all'inizio del saggio, il numero di maschi fertili, il numero di femmine incinte, i tipi di cambiamento e la percentuale degli animali che mostrano ciascun tipo di cambiamento. Quando possibile, i risultati numerici dovrebbero essere valutati con un metodo statistico idoneo. Qualsiasi metodo statistico generalmente riconosciuto può essere utilizzato.

3. RELAZIONE

3.1. Relazione sul saggio

Nella relazione sul saggio devono figurare, se possibile:

— specie/ceppo usato,

— dati sulla risposta tossica per sesso e per dose, compresa la fertilità, la gestazione normale e la vitalità,

- tempo di morte durante lo studio o, se gli animali sono sopravvissuti fino al tempo previsto per il sacrificio, alla conclusione dello studio,
- tabella indicante i pesi di ogni figliata, il peso medio dei piccoli ed i pesi individuali dei piccoli a termine,
- effetto tossico o altri effetti sulla riproduzione, sulla prole, sulla crescita postnatale,
- data di osservazione di ogni segno anomalo e decorso successivo,
- dati sul peso corporeo degli animali P,
- risultati della microscopia,
- descrizione particolareggiata di tutti i risultati degli esami microscopici,
- elaborazione statistica dei risultati, quando appropriata,
- discussione dei risultati,
- interpretazione dei risultati.

3.2. **Valutazione ed interpretazione**

Vedi introduzione generale, parte B.

4. **RIFERIMENTI**

Vedi introduzione generale, parte B.

SAGGIO DI TOSSICITÀ SULLA RIPRODUZIONE: DUE GENERAZIONI

1. METODO

1.1. Introduzione

Vedi introduzione generale, parte B.

1.2. Definizioni

Vedi introduzione generale, parte B.

1.3. Sostanze di riferimento

Nessuna.

1.4. Principi del metodo di saggio

La sostanza in esame è somministrata in dosi graduate a diversi gruppi di animali maschi e femmine. I maschi della generazione P dovrebbero essere sottoposti a dosaggio durante la crescita per almeno un ciclo spermatogenico completo (approssimativamente 56 giorni nel topo e 70 giorni nel ratto) affinché la sostanza in esame provochi ogni effetto contrario sulla spermatogenesi.

Le femmine della generazione P dovrebbero essere dosate per almeno due cicli estrali completi perché la sostanza in esame provochi ogni effetto contrario sull'estro. Allo svezzamento, la somministrazione della sostanza viene continuata sulla prole F_1 durante la crescita fino all'età adulta, durante l'accoppiamento e la produzione di una generazione F_2, e finché la generazione F_2 sia svezzata. Per la somministrazione per inalazione della sostanza sperimentale, il metodo richiederà modifiche.

1.5. Criteri qualitativi

Nessuno.

1.6. Descrizione del metodo di saggio

Preparazioni

Prima della prova, gli animali sani sono mescolati con metodo casuale ed assegnati ai gruppi trattati e di controllo. Gli animali genitori P sono tenuti nelle condizioni sperimentali di alloggiamento e nutrizione per almeno 5 giorni prima della prova. Si raccomanda di somministrare la sostanza in esame nella dieta o nell'acqua da bere. Sono accettabili anche altre vie di somministrazione. Tutti gli animali dovrebbero essere dosati con lo stesso metodo durante l'intero periodo sperimentale. Se un veicolo od altri additivi sono utilizzati per facilitare il dosaggio, essi non dovrebbero notoriamente produrre effetti tossici. Il dosaggio dovrebbe essere effettuato su una base di sette giorni per settimana.

Animali da esperimento: scelta della specie

Il ratto o il topo sono le specie preferite. Si dovrebbero usare animali sani *P*, non sottoposti a esperimenti in precedenza. Non si dovrebbero usare ceppi a bassa fecondità. Gli animali da laboratorio dovrebbero essere caratterizzati quanto alla specie, al ceppo, al sesso, al peso e/o all'età.

Per un'adeguata valutazione della fertilità, si dovrebbero studiare sia i maschi che le femmine. Tutti gli animali del gruppo di saggio e di quello di controllo dovrebbero essere svezzati *prima* dell'inizio del dosaggio.

Numero e sesso

Ogni gruppo di saggio e di controllo dovrebbe contenere un numero sufficiente di animali perché vi siano circa 20 femmine incinte o al termine della gravidanza. L'obiettivo è di avere sufficienti gravidanze e prole per assicurare una valutazione significativa del potenziale della sostanza di influire negativamente sulla fertilità, sulla gravidanza,

sul comportamento materno e sul lattante, sulla crescita e sullo sviluppo della prole F_1, dal concepimento alla maturità, e lo sviluppo della loro prole F_2 fino allo svezzamento.

Condizioni sperimentali

Il cibo e l'acqua dovrebbero essere forniti ad libitum. Nell'imminenza del parto, le femmine incinte dovrebbero essere messe in gabbie separate o in gabbie apposite per il parto e possono essere rifornite di materiale per la costruzione della tana.

Livelli di dose

Si dovrebbero usare almeno tre gruppi di trattamento e un gruppo di controllo. Se si usa un veicolo per la somministrazione della sostanza in esame, il gruppo di controllo dovrebbe ricevere il veicolo al livello di dose più elevato usato. Se una sostanza in esame produce una riduzione dell'ingestione o dell'utilizzazione della dieta, si potrebbe considerare necessario l'uso di un gruppo di controllo parallelo. Idealmente, a meno che non sia limitato dalla natura fisico/chimica o dagli effetti biologici della sostanza in esame, il livello di dose più elevato dovrebbe indurre effetti tossici, ma non mortalità nei genitori P. La dose(i) intermedia(e) dovrebbe(ro) indurre effetti tossici minimi attribuibili alla sostanza di saggio e la dose più bassa non dovrebbe indurre effetti contrari osservabili sui genitori o sulla prole. Quando somministrato con sonda o in capsula, il dosaggio di ogni animale dovrebbe essere basato sul peso corporeo del singolo animale e regolato settimanalmente per tener conto dei cambiamenti del peso corporeo. Per le femmine gravide, i dosaggi possono essere basati sul peso corporeo al giorno 0 o al 6° giorno di gravidanza, se lo si desidera.

Saggio limite

Nel caso di sostanze e bassa tossicità, se un livello di dose di almeno 1 000 mg/kg non produce sintomi di interferenza con la funzione riproduttiva, studi con altri livelli di dose possono essere considerati non necessari. Se uno studio preliminare con un livello di dose elevato, con evidenza precisa di tossicità materna, non evidenzia effetti avversi sulla fertilità, studi con altri livelli di dose possono essere considerati non necessari.

Svolgimento del saggio

Programmi sperimentali

Il dosaggio giornaliero dei genitori maschi P dovrebbe cominciare a circa cinque-nove settimane di età, dopo svezzamento e acclimatazione per almeno 5 giorni. Nei ratti, il dosaggio viene continuato per dieci settimane prima del periodo di accoppiamento (per i topi, otto settimane). I maschi dovrebbero essere sacrificati ed esaminati sia alla fine del periodo di accoppiamento oppure, alternativamente, essi possono essere mantenuti con la dieta sperimentale per la possibile produzione di una seconda figliata e dovrebbero essere sacrificati ed esaminati un po' prima della fine dello studio. Per le femmine genitrici P il dosaggio dovrebbe cominciare dopo almeno 5 giorni di acclimatazione e continuare per almeno due settimane prima dell'accoppiamento. Il dosaggio giornaliero delle femmine P dovrebbe continuare durante il periodo di accoppiamento di tre settimane, la gravidanza e fino allo svezzamento della prole F_1. Si dovrebbe porre attenzione a modifiche del programma di dosaggio sulla base di altre informazioni disponibili sulla sostanza in esame, quali l'induzione del suo metabolismo o bioaccumulazione.

Il dosaggio degli animali F_1 comincia allo svezzamento e termina quando essi vengono sacrificati.

Procedura di accoppiamento

Negli studi degli effetti tossici sulla riproduzione si possono usare i seguenti sistemi di accoppiamento: 1:1 (un maschio e una femmina), oppure 1:2 (un maschio e due femmine).

Usando il sistema di accoppiamento 1:1 si dovrebbe mettere una femmina con lo stesso maschio finché la femmina non rimanga gravida o finché non siano trascorse tre settimane. Ogni mattina le femmine dovrebbero essere esaminate per la presenza di sperma o di tappi vaginali. Il giorno 0 di gravidanza è definito come il giorno in cui si trova un tappo vaginale oppure lo sperma.

Tenendo conto della spermatogenesi, la prole F_1 non dovrebbe essere accoppiata fino all'età di almeno 11 settimane per i topi, e di 13 settimane per i ratti. Per l'accoppiamento della prole F_1, un maschio ed una femmina sono scelti con metodo casuale tra ogni figliata per accoppiamento incrociato con un animale di un'altra figliata dello stesso gruppo di dosaggio, per produrre la generazione F_2. I maschi e le femmine F_1 non scelti per l'accoppiamento sono sacrificati allo svezzamento.

Le coppie che non riescono ad accoppiarsi dovrebbero essere studiate per determinare la causa della sterilità apparente. Questo può comportare procedure quali, ad esempio, quella di fornire opportunità supplementari di accoppiamento con altri maschi o femmine provati, esame microscopico degli organi riproduttivi, e esame del ciclo estrale o della spermatogenesi.

Dimensioni della figliata

Gli animali sottoposti a dosaggio durante lo studio di fertilità vengono lasciati partorire normalmente ed allevare liberamente la prole fino alla fase di svezzamento.

Se si effettua una standardizzazione, si suggerisce la seguente procedura. Tra il 1° ed il 4° giorno dopo la nascita, la dimensione di ogni figliata può essere regolata eliminando i piccoli in più, in modo da avere, nella misura del possibile quattro maschi e quattro femmine per figliata.

Ogni volta che il numero di maschi o di femmine non permette di avere quattro animali di ogni sesso per figliata, è accettabile una regolazione parziale (per esempio, cinque maschi e tre femmine). La normalizzazione non è applicabile alle figliate di meno di otto piccoli. La standardizzazione delle figliate F_1 è condotta nello stesso modo.

Osservazioni

Durante tutto il periodo di saggio, ogni animale dovrebbe essere sottoposto ad osservazione almeno una volta al giorno. Si dovrebbero registrare tutte le variazioni comportamentali pertinenti, i segni di parto difficile o prolungato, e tutti i sintomi di tossicità, compresa la mortalità. Nei periodi precedenti e durante l'accoppiamento, il consumo alimentare può essere misurato settimanalmente. *A scelta, il consumo alimentare durante la gravidanza* potrà essere misurato ogni giorno. Dopo il parto e durante la lattazione, le misurazioni del consumo di alimento dovrebbero essere effettuate nello stesso giorno della pesatura delle figliate. Gli animali genitori (P ed F_1) dovrebbero essere pesati *nel primo giorno del dosaggio e in seguito settimanalmente*. Queste osservazioni dovrebbero essere registrate individualmente per ogni animale adulto.

La durata della gestazione dovrebbe essere calcolata dal giorno *0 di gravidanza*. Ogni figliata dovrebbe essere esaminata non appena possibile dopo il parto per stabilire il numero ed il sesso dei piccoli, dei nati morti, dei nati vivi e la presenza di grosse anomalie. I piccoli morti e quelli sacrificati al 4° giorno dovrebbe essere conservati per la constatazione di possibili difetti.

Si dovrebbero contare i nati vivi e procedere alla pesatura delle figliate il mattino dopo la nascita, poi il 4° e il 7° giorno e quindi settimanalmente *fino al termine dell'esperimento quando gli animali* dovrebbero essere pesati individualmente. Si dovrebbero registrare le anomalie comportamentali delle genitrici e della prole.

Patologia

Necroscopia

Tutti gli animali *adulti P ed F_1 dovrebbero* essere sacrificati quando non più necessari per valutare gli effetti riproduttivi. La prole F_1 non selezionata per l'accoppiamento e tutta la prole F_2 dovrebbe essere sacrificata una volta svezzata.

Al momento del sacrificio o della morte durante lo studio, tutti gli animali genitori (P ed F_1) dovrebbero essere esaminati microscopicamente per l'individuazione di tutte le anomalie strutturali o le mutazioni patologiche, *dedicando particolare attenzione* agli organi del sistema riproduttivo. I piccoli morti o moribondi dovrebbero essere esaminati per individuare eventuali anomalie.

Istopatologia

Le ovaie, l'utero, il collo dell'utero, la vagina, i testicoli, l'epididimo, le vescichette seminali, la prostata, la ghiandola della coagulazione, la ghiandola pituitaria e l'organo(i)-bersaglio di tutti gli animali P dovrebbero essere conservati per l'esame microscopico. Nel caso in cui questi organi non siano stati esaminati in altri studi con dosi multiple, essi dovrebbero essere esaminati microscopicamente in tutti gli animali dei gruppi trattati con dose elevata e di controllo e negli animali che muoiono durante l'esperimento, quando fattibile. Gli organi che mostrano anomalie in questi animali dovrebbero quindi essere esaminati in tutti gli altri gruppi di dose. In questo caso, si dovrebbe eseguire l'esame microscopico di tutti i tessuti che mostrano alterazioni patologiche macroscopiche. Come suggerito per le procedure di accoppiamento, gli organi riproduttivi degli animali sospetti di sterilità possono essere sottoposti all'esame microscopico.

2. **DATI**

Elaborazione dei risultati

I dati possono essere riassunti sotto forma di tabella, indicando per ogni gruppo sperimentale il numero di animali all'inizio del saggio, il numero di animali gravidi, i tipi di cambiamento e la percentuale degli animali che mostrano ciascun tipo di cambiamento.

Quando possibile, i risultati numerici dovrebbero essere valutati con un metodo statistico idoneo. Qualsiasi metodo statistico generalmente accettato può essere utilizzato.

3. **RELAZIONE**

3.1. **Relazione sul saggio**

Nella relazione sul saggio devono figurare, se possibile:

— specie/ceppo usato,

— dati sulla risposta tossica per sesso e per dose, inclusi gli indici di fertilità, gestazione e vitalità,

— tempo di morte durante lo studio o se gli animali sono sopravvissuti fino alla conclusione dello studio,

— tabella indicante i pesi di ogni figliata, il peso medio dei piccoli ed i pesi individuali dei piccoli a termine,

— effetti tossici o altri effetti sulla riproduzione, sulla prole, sulla crescita postnatale,

— data di osservazione di ogni segno anomalo e decorso successivo,

— dati sul peso corporeo degli animali P e F_1,

— risultati della microscopia,

— descrizione particolareggiata di tutti i risultati degli esami microscopici,

— elaborazione statistica dei risultati, quando appropriata,

— discussione dei risultati,

— interpretazione dei risultati.

3.2. **Valutazione ed interpretazione**

Vedi introduzione generale, parte B.

4 **RIFERIMENTI**

Vedi introduzione generale, parte B.

TOSSICOCINETICA

1. METODO

1.1. Introduzione

Vedi introduzione generale, parte B.

1.2. Definizioni

Vedi introduzione generale, parte B.

1.3. Sostanze di riferimento

Nessuna.

1.4. Principi del metodo di saggio

Si somministra la sostanza in esame per una via appropriata. In relazione agli obiettivi dello studio, la sostanza può essere somministrata, in dose singola o in dosi ripetute nel corso di periodi di tempo definiti, a uno o più gruppi di animali da esperimento. Successivamente, in relazione al tipo di studio effettuato, si determinano la sostanza e/o i suoi metaboliti nei fluidi corporei e nei tessuti e/o negli escreti.

Gli studi possono essere effettuati con forme «non marcate» o «marcate» delle sostanze in esame. Quando è fatto uso di un marcatore, è opportuno che esso sia collocato nella sostanza in maniera tale da fornire la maggior quantità possibile di informazioni sul destino del composto.

1.5. Criteri qualitativi

Nessuno.

1.6. Descrizione del metodo di saggio

Preparazioni

Si acclimatano alle condizioni del laboratorio per almeno cinque giorni prima del saggio animali adulti sani e giovani. Prima del saggio gli animali vengono mischiati con metodo casuale ed assegnati ai gruppi destinati ai trattamenti. In situazioni speciali possono essere usati animali molto giovani, femmine gravide o pretrattati.

Condizioni sperimentali

Animali da esperimento

Gli studi tossicocinetici possono essere effettuati su una o più specie animali appropriate, e dovrebbero tenere conto delle specie usate o che si pensa di usare per altri studi tossicologici sulla medesima sostanza in esame. Quando in un saggio si fa uso di ratti, la variazione del peso corporeo non dovrebbe essere maggiore del ± 20 % del peso medio.

Numero e sesso

Per gli studi di assorbimento e di escrezione sarebbe opportuno che in ciascun gruppo di dose vi siano inizialmente quattro animali. Una preferenza per l'uno o l'altro sesso non è imperativa, ma in determinate circostanze può essere necessario studiare entrambi i sessi. Se vi sono differenze di risposta secondo i sessi, quattro individui per sesso dovrebbero essere sottoposti al saggio. Nel caso di studi su animali diversi dai roditori può essere usato un numero minore di individui.

Quando si studia la distribuzione nei tessuti, la grandezza del gruppo iniziale dovrebbe tenere conto sia del numero degli animali da sacrificare in ciascuna fase che del numero delle fasi da considerare.

Negli studi del metabolismo le dimensioni del gruppo sono in relazione con le esigenze specifiche dello studio. Per gli studi con dosi multiple e in fasi multiple, le dimensioni del gruppo dovrebbero tenere conto del numero sia delle fasi che dei sacrifici in programma, e in ogni caso il gruppo non deve comprendre meno di due animali. Le dimensioni del gruppo dovrebbero essere sufficienti per fornire una caratterizzazione accettabile dell'assorbimento, del plateau e della deplezione (a seconda del caso considerato) della sostanza in esame e/o dei suoi metaboliti.

Livelli di dosaggio

Nel caso della somministrazione in un'unica dose almeno due livelli di dosaggio dovrebbero essere usati. Vi dovrebbero essere una dose bassa, alla quale non si osservano effetti tossici, e una dose elevata, alla quale vi possono essere cambiamenti dei parametri tossicocinetici o si manifestano effetti tossici.

Nel caso della somministrazione di dosi ripetute la dose bassa è normalmente sufficiente, ma in determinate circostanze può essere necessaria anche una dose alta.

Vie di somministrazione

Gli studi tossicocinetici dovrebbero essere effettuati facendo uso della stessa via e, se del caso, dello stesso veicolo usato, o che si pensa di usare negli altri studi di tossicità. La sostanza in esame è normalmente somministrata per via orale mediante sonda gastrica o nella dieta, o è applicata alla cute, o somministrata per inalazione per periodi di tempo definiti a gruppi di animali da esperimento. Per la determinazione dell'assorbimento relativo per altre vie può essere utile la somministrazione della sostanza in esame per via endovenosa. Entro breve tempo della somministrazione endovenosa di una sostanza è inoltre possibile ottenere utili informazioni sul suo profilo di distribuzione.

Si dovrebbe tener presente la possibilità di un'interferenza fra il veicolo e la sostanza in esame. Si dovrebbe fare attenzione alle differenze di assorbimento fra la somministrazione delle sostanza in esame per sonda gastrica e rispettivamente nell'alimentazione, ed all'esigenza di una determinazione precisa della dose, specialmente quando la sostanza in esame viene somministrata con la dieta.

Periodo di osservazione

Tutti gli animali dovrebbero essere osservati quotidianamente, e dovrebbe essere presa nota di tutti i segni di tossicità e degli altri elementi clinici rilevanti, ivi compresi il momento dell'insorgenza, il grado e la durata.

Procedimento

Dopo la pesatura degli animali di saggio si somministra per una via appropriata la sostanza in esame. Se lo si considera importante, gli animali possono essere tenuti a digiuno prima della somministrazione della sostanza in esame.

Assorbimento

La velocità e l'entità dell'assorbimento della sostanza somministrata possono essere valutate secondo diversi metodi, con o senza gruppi di riferimento (¹), ad esempio:

- **attraverso la determinazione della quantità della sostanza in esame e/o dei suoi metaboliti negli escreti, quali l'urina, la bile, le feci e l'aria inspirata, e della quantità che rimane nella carcassa;**
- **attraverso il raffronto della risposta biologica (ad esempio negli studi della tossicità acuta) fra i gruppi sottoposti al saggio e i gruppi di controllo e/o di riferimento;**
- **attraverso il raffronto della quantità di sostanza e/o di metabolita escreta per via renale nei gruppi sottoposti al saggio e in gruppi di riferimento;**
- **attraverso la determinazione dell'area al di sotto della curva del livello plasmatico in funzione del tempo della sostanza in esame e/o dei suoi metaboliti, e attraverso il raffronto con i dati di un gruppo di riferimento.**

(¹) In questo metodo un gruppo di riferimento è un gruppo nel quale la sostanza in esame è somministrata per un'altra via che permette la disponibilità completa della dose.

Distribuzione

Sono attualmente disponibili due procedure che possono essere usate insieme o separatamente per le analisi dei profili di distribuzione:

— un'utile informazione qualitativa si ottiene facendo uso di tecniche autoradiografiche su tutto il corpo;

— un'informazione quantitativa si ottiene sacrificando gli animali a intervalli diversi dopo l'esposizione e determinando la concentrazione e la quantità della sostanza in esame e/o dei suoi metaboliti nei tessuti e negli organi.

Escrezione

Negli studi di escrezione si raccolgono l'urina, le feci e l'aria espirata e, in determinate circostanze, la bile. La quantità della sostanza in esame e/o dei suoi metaboliti dovrebbe essere misurata in detti escreti ad intervalli diversi dopo l'esposizione, fino a che sia stato escreto intorno al 95 % della dose somministrata, ovvero per sette giorni, secondo la condizione che si verifica per prima.

In casi speciali può essere necessario considerare l'escrezione della sostanza in esame nel latte degli animali da esperimento che allattano i piccoli.

Metabolismo

Per determinare l'estensione e il profilo del metabolismo si dovrebbero analizzare campioni biologici secondo tecniche appropriate. Se vi è la necessità di dare risposta a quesiti derivanti da studi tossicologici precedenti si dovrebbero chiarire le strutture dei metaboliti e proporre vie metaboliche appropriate. Per ottenere informazioni sulle vie metaboliche può essere proficuo effettuare studi in vitro.

Ulteriori informazioni sulle relazioni fra il metabolismo e la tossicità possono essere ottenute da studi biochimici, quali la determinazione degli effetti sui sistemi di enzimi metabolizzanti, sulla deplezione dei composti sulfidrilici endogeni non proteici e sull'unione della sostanza con macromolecole.

2. DATI

In relazione al tipo di studio effettuato i dati dovrebbero essere riassunti in forma di tabella integrata se del caso da rappresentazioni grafiche. Per ciascun gruppo di saggio dovrebbero essere poste in evidenza, in tutti i casi in cui ciò è possibile, le variazioni medie e statistiche delle misurazioni in relazione al tempo, al dosaggio, ai tessuti e agli organi. L'entità dell'assorbimento e la quantità e la velocità dell'escrezione dovrebbero essere determinate con metodi appropriati. Quando si effettuano studi del metabolismo, la struttura dei metaboliti identificati dovrebbe essere data e le possibili vie metaboliche presentate.

3. RELAZIONE

3.1. Relazione sul saggio

Nella relazione sul saggio devono figurare, se possibile:

— specie, ceppo, provenienza, condizioni ambientali, dieta,

— caratterizzazione di eventuali materiali marcati,

— livelli di dosaggio e intervalli usati,

— via o vie di somministrazione ed ogni veicolo usato,

— effetti tossici ed altri effetti osservati,

— metodi per la determinazione della sostanza in esame e/o dei suoi metaboliti nei campioni biologici, ivi compresa l'aria espirata,

— presentazione in forma tabulare delle misurazioni per sesso, dose regime, tempo, tessuti ed organi,

— presentazione dell'entità dell'assorbimento e dell'escrezione nel tempo,

- metodi per la caratterizzazione e l'identificazione di metaboliti nei campioni biologici,
- metodi per le misurazioni biochimiche concernenti il metabolismo,
- vie proposte per il metabolismo,
- discussione dei risultati,
- interpretazione dei risultati.

3.2. **Valutazione e interpretazione**

Vedi introduzione generale, parte B.

4. **RIFERIMENTI**

Vedi introduzione generale, parte B.

SAGGIO DI MUTAGENESI E PRESCREENING DI CANCEROGENESI

MUTAZIONE GENICA: SACCHAROMYCES CEREVISIAE

1. METODO

1.1. Introduzione

Vedi introduzione generale, parte B.

1.2. Definizioni

Vedi introduzione generale, parte B.

1.3. Sostanze di riferimento

Nessuna.

1.4. Principi del metodo di saggio

Per misurare l'induzione di mutazioni geniche indotte da agenti chimici, con e senza attivazione metabolica, può essere fatto uso di una varietà di ceppi aploidi e diploidi del lievito Saccharomyces cerevisiae.

Sono stati utilizzati sistemi di mutazione in avanti in ceppi aploidi, come la misura della mutazione da mutanti rossi, richiedenti adenina (ade-1, ade-2), a doppi mutanti bianchi richiedenti adenina; e sistemi selettivi come l'induzione della resistenza alla canavanina.

Il sistema di retromutazione più largamente convalidato comporta l'uso del ceppo aploide XV 185-14C che porta le mutazioni di tipo «senza senso» (ochre) ade 2-1, arg 4-17, lys 1-1 e trp 5-48, le quali possono essere revertite da mutageni che inducono sostituzioni di base nel sito specifico o mutazioni che sopprimono «ochre». Il ceppo XV 185-14C porta altresì il marcatore his 1 - 7, mutazione di tipo «senso sbagliato» revertita principalmente da mutazioni nel secondo sito, e il marcatore hom 3 - 10 che viene revertito da mutageni che inducono mutazioni del tipo «inserzione-delezione».

Fra i ceppi diploidi del S. cerevisiae il solo largamente convalidato è il ceppo D_7, omozigote per ilv 1-92.

1.5. Criteri qualitativi

Nessuno.

1.6. Descrizione del metodo di saggio

Preparati

È opportuno preparare le soluzioni delle sostanze in esame e dei composti di controllo o di riferimento, servendosi di un veicolo appropriato, al momento dell'effettuazione del test. Con i composti organici non solubili in acqua si devono usare soluzioni di solventi organici quali l'etanolo, l'acetone e il dimetilsolfossido (DMSO) a non più del 2 % in volume (v/v). La concentrazione finale del solvente non dovrebbe influenzare in modo significativo la vitalità cellulare e le caratteristiche di crescita.

Attivazione metabolica

Le cellule vanno esposte alle sostanze in esame sia in presenza che in assenza di un sistema appropriato di *attivazione metabolica esogena.*

Il sistema più comunemente usato è una frazione postmitocondriale integrata con cofattori, ottenuta dai fegati di roditori pretrattati con agenti che inducono enzimi. Per l'attivazione metabolica può essere appropriato anche l'uso di altre specie; di altri tessuti, di altre frazioni postmitocondriali o di altri procedimenti.

Condizioni di effettuazione del saggio

Ceppi

I ceppi più largamente usati negli studi sulle mutazioni geniche sono il ceppo aploide XV 185-14C e il ceppo diploide D_7. Possono essere appropriati anche altri ceppi.

Terreni di coltura

Per la determinazione della sopravvivenza delle cellule e del numero dei mutanti è fatto uso di terreni di coltura appropriati.

Uso di controlli negativi e positivi

È opportuno procedere in parallelo a controlli positivi, non trattati e con il solo solvente. Per ciascun evento genetico specifico vanno usate appropriate sostanze di controllo positivo.

Concentrazioni

Occorre far uso di almeno 5 concentrazioni adeguatamente intervallate della sostanza in esame. Per le sostanze tossiche la concentrazione più elevata usata nel test non deve ridurre la sopravvivenza a meno del 5-10 %. Le sostanze relativamente insolubili in acqua vanno saggiate fino al loro limite di solubilità secondo procedimenti appropriati. Per le sostanze non tossiche completamente solubili in acqua la concentrazione massima va determinata caso per caso.

Condizioni di incubazione

Le piastre vengono incubate per 4-7 giorni a temperatura da 28° a 30 °C nell'oscurità.

Frequenze delle mutazioni spontanee

È opportuno usare subcolture con frequenze delle mutazioni spontanee entro i limiti accettati come normali.

Numero delle repliche

Per la determinazione dei prototrofi che si inducono per mutazione genica e della sopravvivenza cellulare è opportuno fare uso di almeno tre piastre di replica per concentrazione. Nel caso di esperimenti nei quali si usino marcatori a bassa frequenza di mutazione, quali hom 3-10, per poter ottenere dati aventi rilevanza statistica è necessario aumentare il numero delle piastre.

Procedimento

Il trattamento dei ceppi di S. cerevisiae viene normalmente effettuato secondo un procedimento di test in sospensione liquida con impiego di cellule quiescenti o in crescita. Gli esperimenti iniziali dovrebbero essere condotti su cellule in crescita. Si espongono alla sostanza in esame per una durata fino a 18 ore a temperatura da 28° a 37 °C e in agitazione 1-5 X 10^7 cellule/ml; in casi opportuni, nel corso del trattamento si aggiunge una quantità adeguata di un sistema di attivazione metabolica. Al termine del trattamento si procede alla centrifugazione ed al lavaggio delle cellule ed alla loro semina su un terreno di coltura appropriato. Dopo incubazione si analizzano le piastre per la determinazione della sopravvivenza e dell'induzione della mutazione genica.

Se il primo esperimento è negativo il secondo esperimento dovrebbe essere condotto su cellule quiescenti; se il primo esperimento è positivo, viene confermato in un appropriato esperimento indipendente.

2. DATI

I dati devono essere presentati in forma di tabelle, con indicazione del numero delle colonie contate, del numero di mutanti, della sopravvivenza e della frequenza dei mutanti. Tutti i risultati devono essere confermati in un esperimento indipendente. I dati devono essere stabiliti secondo metodi statistici appropriati.

3. RELAZIONE

3.1. Relazione sul saggio

Nella relazione sul saggio devono figurare, se possibile:

- ceppo usato,
- condizioni di effettuazione del test: cellule in fase stazionaria o in crescita, composizione dei terreni, temperatura e durata dell'incubazione, sistemi di attivazione metabolica,
- condizioni del trattamento: livelli di esposizione, procedimento e durata del trattamento, temperatura di trattamento, controlli positivi e negativi,
- numero delle colonie contate, numero di mutanti, sopravvivenza e frequenza dei mutanti, relazione dose/risposta se disponibile, valutazione statistica dei dati,
- discussione dei risultati,
- interpretazione dei risultati.

3.2. Valutazione ed interpretazione

Vedi introduzione generale, parte B.

4. RIFERIMENTI

Vedi introduzione generale, parte B.

RICOMBINAZIONE MITOTICA: SACCHAROMYCES CEREVISIAE

1. METODO

1.1. Introduzione

Vedi introduzione generale, parte B.

1.2. Definizioni

Vedi introduzione generale, parte B.

1.3. Sostanze di riferimento

Nessuna.

1.4. Principi del metodo di saggio

La ricombinazione mitotica in Saccharomyces cerevisiae può essere rilevata fra geni (o in linea più generale fra un gene e il suo centromero) e all'interno dei geni. La prima delle due eventualità è denominata crossing-over mitotico e genera prodotti reciproci, mentre la seconda eventualità è per lo più non reciproca ed è denominata conversione genica. Il crossing-over viene generalmente determinato mediante la produzione di colonie o settori recessivi omozigoti in un ceppo eterozigote, mentre la conversione genica viene determinata attraverso la produzione di revertanti prototrofici in un ceppo auxotrofico eteroallelomorfo portante due diversi alleli del medesimo gene. I ceppi più comunemente usati per la rilevazione della conversione genica mitotica sono i ceppi D_4 (eteroallelomorfo in ade 2 e trp 5), D_7 (eteroallelomorfo in trp 5), BZ_{34} (eteroallelomorfo in arg 4) e JD1 (eteroallelomorfo in his 4 e trp 5). Il crossing-over mitotico producente settori omozigoti di colore rosso e rosa può essere determinato nel ceppo D_5 o in D_7 (che misura anche la conversione genica mitotica e la retromutazione in ilv 1-92), essendo entrambi i ceppi eteroallelomorfi per alleli complementanti di ade 2.

1.5. Criteri qualitativi

Nessuno.

1.6. Descrizione del metodo di saggio

Preparazioni

È opportuno preparare le soluzioni della sostanza in esame e dei composti di controllo o di riferimento, facendo uso di un solvente appropriato, al momento di procedere all'effettuazione del test. Con i composti organici non solubili in acqua è opportuno usare solventi organici come l'etanolo, l'acetone e il dimetilsolfossido (DMSO) a non più del 2% (v/v). La concentrazione finale del solvente non dovrebbe alterare significativamente la vitalità cellulare e le caratteristiche di crescita.

Attivazione metabolica

Le cellule devono essere esposte alle sostanze in esame sia in presenza che in assenza di un sistema appropriato di attivazione metabolica esogena. Il sistema più comunemente usato è una frazione postmitocondriale supplementare con cofattori e ottenuta dal fegato di roditori pretrattati con agenti che inducono enzimi. Per l'attivazione metabolica può essere appropriato anche l'impiego di altre specie, di altri tessuti, di altre frazioni postmitocondriali o di altri procedimenti.

Condizioni sperimentali

Ceppi

I ceppi più frequentemente usati sono i ceppi diploidi D_4, D_5, D_7, e JD1. Può essere appropriato anche l'impiego di altri ceppi.

Terreni di coltura

Per la determinazione della sopravvivenza e della frequenza della ricombinazione mitotica si devono usare terreni di coltura appropriati.

Uso di controlli negativi e positivi

È opportuno effettuare in parallelo controlli positivi, controlli non trattati o trattati con solo solvente. Per ciascun tipo specifico di ricombinazione devono essere usate le appropriate sostanze di controllo positivo.

Concentrazioni

È opportuno fare uso di almeno cinque concentrazioni della sostanza in esame adeguatamente intervallate. Tra i fattori da prendere in considerazione vi sono la citotossicità e la solubilità. La concentrazione più bassa non deve produrre alcun effetto sulla vitalità cellulare. Per le sostanze tossiche, la più alta concentrazione saggiata non deve ridurre la sopravvivenza a meno del 5-10%. Le sostanze relativamente insolubili in acqua devono essere saggiate fino al loro limite di solubilità secondo procedimenti appropriati. Per le sostanze non tossiche altamente solubili in acqua la concentrazione massima del test va determinata caso per caso.

Le cellule possono essere esposte alle sostanze in esame in fase stazionaria o in fase di crescita per periodi fino a 18 ore. Nel caso di tempi di trattamento prolungati occorre tuttavia accertare mediante esame microscopico che nelle culture non vi sia formazione di spore, la cui presenza invaliderebbe il test.

Condizioni di incubazione

Le piastre vengono incubate nell'oscurità per 4-7 giorni a temperatura da 28 ° a 30 °C. Le piastre usate per l'analisi dei settori omozigoti di colore rosso e roseo derivanti dal crossing-over mitotico vanno tuttavia tenute in frigorifero (4 °C) per un altro ciclo di uno o due giorni prima dell'analisi, per dare tempo allo sviluppo del pigmento nelle colonie ricombinanti.

Frequenze della ricombinazione mitotica spontanea

È opportuno usare subcolture con frequenze di ricombinazione mitotica spontanea entro i limiti accettati come normali.

Numero delle repliche

Per la determinazione dei prototrofi prodotti dalla conversione genica mitotica e per quella della sopravvivenza è opportuno fare uso di un minimo di tre piastre di replica per concentrazione. Nella determinazione della omozigosi recessiva derivante dal crossing-over mitotico il numero delle piastre va aumentato in modo da ottenere un numero adeguato di colonie.

Procedimento

Il trattamento dei ceppi di S. cerevisiae viene normalmente effettuato in un procedimento di test in sospensione liquida con cellule in fase stazionaria o in fase di crescita. Esperimenti iniziali dovrebbero essere condotti su cellule in fase di crescita. Si espongono alla sostanza in esame per una durata fino a 18 ore a temperatura da 28 ° a 37 °C con scuotimento 1 - 5 × 10^7 cellule/ml; nel corso del trattamento, nei casi opportuni si aggiunge una quantità adeguata di un sistema di attivazione metabolica. Al termine del trattamento si procede alla centrifugazione ed al lavaggio delle cellule ed alla loro semina su un terreno di coltura appropriato. Dopo l'incubazione si analizzano le piastre per la determinazione della sopravvivenza e dell'induzione della ricombinazione mitotica.

Se il primo esperimento è negativo il secondo dovrebbe essere eseguito su cellule quiescenti; se il primo esperimento è positivo, il secondo viene confermato in un esperimento indipendente appropriato.

2. DATI

I dati devono essere presentati in forma di tabelle, con indicazione del numero dei ricombinanti, della sopravvivenza e della frequenza dei ricombinanti.

Tutti i risultati devono essere confermati in un esperimento indipendente. I dati vanno stabiliti per valutazione secondo metodi statistici appropriati.

3. RELAZIONE

3.1. Relazione sul saggio

Nella relazione sul saggio devono figurare, se possibile:

— ceppo usato,

— condizioni di effettuazione del test: cellule in fase stazionaria o di crescita, composizione dei terreni, temperatura e durata dell'incubazione, sistemi di attivazione metabolica,

— condizioni del trattamento: concentrazione di esposizione, procedimento e durata del trattamento, temperatura di trattamento, controlli positivi e negativi,

— numero di colonie contate, numero dei ricombinanti, frequenza della sopravvivenza e della ricombinazione, relazione dose/risposta se possibile, valutazione statistica dei dati,

— discussione dei risultati,

— interpretazione dei risultati.

3.2. Valutazione ed interpretazione

Vedi introduzione generale, parte B.

4. RIFERIMENTI

Vedi introduzione generale, parte B.

CELLULE DI MAMMIFERI IN VITRO: SAGGIO DI MUTAZIONE GENICA

1. METODO

1.1. Introduzione

Vedi introduzione generale, parte B.

1.2. Definizione

Vedi introduzione generale, parte B.

1.3. Sostanze di riferimento

Nessuna.

1.4. Principi del metodo di saggio

Per la rilevazione di mutazioni indotte da sostanze chimiche può essere fatto uso di sistemi di coltura di cellule di mammiferi. Fra i tipi di cellule più largamente usati figurano le cellule di linfoma di topo L5178Y e le linee CHO e V-79 di cellule di hamster cinese. In queste linee cellulari i sistemi più comunemente usati misurano mutazioni nei loci della timidina chinasi (TK), della ipoxantina guanina fosforibosil transferasi (HPRT) (1) e della Na^+/K^+ ATPase. I sistemi di mutazioni della TK e della HPRT evidenziano mutazioni del tipo «sostituzione di base», mutazioni del tipo «inserzione-delezione» e piccole delezioni; il sistema Na^+/K^+ segnala soltanto mutazioni del tipo «sostituzione di base».

Le cellule deficienti di timidina kinasi (TK), a causa della mutazione in avanti $TK^+ \rightarrow TK^-$, sono resistenti alla bromodeossiuridina (BrdU), alla fluorodeossiuridina (FdU) e alla trifluorotimidina (TFT), non essendo detti antimetaboliti incorporati in nucleotidi cellulari dalla timidina chinasi del sistema enzimatico «di recupero»; i nucleotidi occorrenti per il metabolismo cellulare sono ottenuti unicamente dalla sintesi de novo. In presenza di timidina chinasi la BrdU, la FdU e la TFT sono per contro incorporate nei nucleotidi, con conseguente inibizione del metabolismo cellulare e della citotossicità. Le cellule mutanti sono così in grado di proliferare in presenza di BrdU, FdU o di TFT, mentre le cellule normali, che contengono timidina chinasi, non lo possono fare.

Analogamente le cellule con insufficienza di HPRT sono selezionate per resistenza alla 8-azaguanina (AG) o alla 6-tioguanina (TG). Le cellule con alterazione della Na^+/K^+ ATPase sono selezionate per resistenza alla ouabaina.

Per la determinazione della citotossicità si misura l'effetto della sostanza in esame sulla capacità di formazione di colonie (efficienza di clonaggio) o sui tassi di crescita delle colture. La determinazione della frequenza dei mutanti si effettua a sua volta seminando numeri noti di cellule in un terreno contenente l'agente selettivo per individuare le cellule mutanti, e in un terreno senza agente selettivo per determinare l'efficienza di clonaggio. Dopo un appropriato periodo di incubazione si contano le colonie. Le frequenze dei mutanti si calcolano in base al numero delle colonie di mutanti con la correzione relativa all'efficienza di clonaggio delle cellule.

1.5. Criteri qualitativi

Nessuno.

1.6. Descrizione del metodo di saggio

Preparazioni

Cellule

Per il tipo di determinazione qui considerato è disponibile tutta una serie di linee cellulari. Esse comprendono dei subcloni di cellule L5178Y, CHO o di cellule V-79 delle quali sono state dimostrate la sensibilità agli agenti mutageni chimici, l'elevata efficienza di clonaggio e la bassa frequenza di mutazioni spontanee. Le cellule possono essere controllate periodicamente per quel che riguarda la stabilità dei cariotipo, ed è comunque opportuno accertare l'assenza in esse di contaminazione da micoplasma. È possibile usare anche altri tipi di cellule, a condizione che ne sia pienamente documentata la validità per la determinazione delle mutazioni geniche indotte chimicamente.

(1) Già HGPRT.

Terreni di coltura

È necessario valersi di terreni di coltura e di condizioni di incubazione (temperatura, recipienti di coltura, concentrazioni di CO_2, umidità, ecc.) appropriati. I terreni e i sieri vanno scelti in relazione ai sistemi selettivi e al tipo di cellule usati nella determinazione.

Sostanza in esame

Le sostanze in esame possono essere preparate in terreni di coltura ovvero disciolte o poste in sospensione in veicoli appropriati prima del trattamento delle cellule. La concentrazione finale del veicolo nel sistema di coltura non deve influire sulla vitalità delle cellule o sul loro tasso di crescita.

Attivazione metabolica

È opportuno esporre le cellule alla sostanza in esame sia in presenza che in assenza di un sistema esogeno di attivazione metabolica dei mammiferi. Alternativamente, quando si fa uso di tipi di cellule con attività metabolica endogena è opportuno che l'entità e la natura di detta attività siano conosciute come appropriate alla classe clinica che si sta esaminando.

Condizioni sperimentali

Uso di controlli positivi e negativi

È opportuno includere in ciascun esperimento dei controlli positivi, valendosi sia di un composto ad azione diretta che di un composto per il quale occorre attivazione metabolica; è altresì opportuno effettuare un controllo negativo (del veicolo).

Quali esempi di sostanze che si prestano ad essere usate come controlli positivi si possono citare le seguenti:

— composti ad azione diretta:
   — etilmetansulfonato,
   — icantone,
— composti ad azione indiretta:
   — 2-acetilaminofluorene,
   — 7, 12-dimetilbenzantracene,
   — N-nitrosodimetilamina.

Se del caso, si può ancora aggiungere un ulteriore controllo positivo della medesima classe chimica della sostanza in esame.

Concentrazioni

È opportuno fare uso di diverse concentrazioni della sostanza in esame. Dette concentrazioni devono produrre un effetto tossico proporzionale alle concentrazioni stesse, nel senso che la concentrazione più elevata dà luogo ad un livello ridotto di sopravvivenza, mentre alla concentrazione più bassa la sopravvivenza è approssimativamente dello stesso ordine che nel controllo negativo. Le sostanze relativamente insolubili in acqua vanno saggiate fino al loro limite di solubilità secondo procedure appropriate. Per le sostanze non tossiche completamente solubili in acqua la concentrazione più elevata della sostanza all'esame va determinata caso per caso.

Procedimento

Il numero delle cellule usate per le varie colture deve essere in relazione con la frequenza delle mutazioni spontanee; un criterio di carattere generale consiste nell'usare un numero di cellule vitali pari al decuplo dell'inverso delle frequenze delle mutazioni spontanee.

Le cellule vanno esposte all'effetto delle sostanze per una durata adeguata; nella maggior parte dei casi è efficace un'esposizione da 2 a 5 ore. Le cellule che non hanno un'attività metabolica endogena sufficiente devono di preferenza essere esposte alla sostanza in esame sia in presenza che in assenza di un appropriato sistema di attivazione metabolica. Al termine del periodo di esposizione le cellule vengono lavate da ogni traccia della sostanza in esame e poste in coltura per la determinazione dell'efficienza di clonaggio e per consentire l'espressione del fenotipo mutante.

Al termine del periodo di espressione, che deve essere sufficientemente lungo per rendere possibile un'espressione fenotipica pressocché ottimale dei mutanti indotti, le cellule vengono coltivate in un mezzo rispettivamente con e senza agenti selettivi per la determinazione del numero dei mutanti e dell'efficienza di clonaggio.

Tutti i risultati vengono confermati in un esperimento indipendente.

2. DATI

I dati devono essere presentati in forma di tabelle. Devono essere presentati i conteggi delle singole piastre, per la sostanza in esame e per il controllo, sia per l'induzione delle mutazioni che per la sopravvivenza. Devono altresì essere indicati il numero medio delle colonie per piastra e la deviazione standard. La frequenza delle mutazioni va espressa quale numero dei mutanti in relazione al numero delle cellule sopravvissute. La sopravvivenza e l'efficienza di clonaggio sono espresse in forma di percentuale del livello del controllo. I dati devono essere valutati secondo metodi statistici appropriati.

3. RELAZIONE

3.1. Relazione sul saggio

Nella relazione sul saggio devono figurare, se possibile:

- tipo di cellule usate, numero delle colture di cellule, metodi per il mantenimento delle colture di cellule,
- condizioni di effettuazione del test: composizione dei terreni, concentrazione di CO_2, concentrazione della sostanza in esame, solvente usato, temperatura di incubazione, tempo di incubazione, durata del periodo di espressione (se necessario, con indicazione del numero delle cellule seminate, delle subcolture e dello schema di mantenimento), durata del trattamento, densità delle cellule durante il trattamento, tipo di sistema di attivazione metabolica dei mammiferi usato, controlli positivi e negativi, agente selettivo usato,
- ragioni della selezione delle dosi,
- metodo usato per il conteggio delle cellule vitali e delle cellule mutanti,
- valutazione statistica,
- discussione dei risultati,
- interpretazione dei risultati.

3.2. Valutazione ed interpretazione

Vedi introduzione generale, parte B.

4. RIFERIMENTI

Vedi introduzione generale, parte B.

DANNO E RIPARAZIONE DEL DNA: SINTESI NON PROGRAMMATA DEL DNA — CELLULE DI MAMMIFERO IN VITRO

1. METODO

1.1. Introduzione

Vedi introduzione generale, parte B.

1.2. Definizioni

Vedi introduzione generale, parte B.

1.3. Sostanze di riferimento

Nessuna

1.4. Principi del metodo di saggio

Il test della sintesi non programmata del DNA — Unscheduled DNA Synthesis (UDS) — misura la sintesi di riparazione del DNA dopo l'escissione e la rimozione di un tratto di DNA contenente la zona del danno indotto da agenti chimici e fisici. Il test si basa sull'incorporazione di timidina marcata con trizio (^{3}H-TdR) nel DNA di cellule di mammiferi che non si trovano nella fase S del ciclo cellulare. L'assunzione di ^{3}H-TdR può essere determinata per autoradiografia oppure mediante conteggio per scintillazione in fase liquida — liquid scintillation counting (LSC) — del DNA dalle cellule trattate. Le cellule di mammiferi in coltura, salvo nel caso che si faccia uso di epatociti primari di topo, vengono trattate con l'agente all'esame con e senza un sistema di attivazione metabolica esogena. La UDS può essere misurata anche in sistemi in vivo.

1.5. Criteri qualitativi

Nessuno.

1.6. Descrizione del metodo di saggio

Preparazioni

Le sostanze in esame e quelle di controllo o di riferimento vanno preparate in terreno di crescita ovvero disciolte o poste in sospensione in veicoli appropriati e poi ancora diluite in terreno di crescita prima di essere utilizzate per il test. La concentrazione finale del veicolo non deve produrre alcun effetto sulla vitalità delle cellule.

Nel test possono essere utilizzate colture primarie di epatociti di ratto, di linfociti umani o di linee cellulari stabilizzate (ad esempio fibroblasti diploidi umani).

È opportuno esporre le cellule alla sostanza in esame sia in presenza che in assenza di un sistema appropriato di attivazione metabolica.

Condizioni sperimentali

Numero di colture

Sono necessarie almeno due colture di cellule per l'autoradiografia e sei colture (o meno, se giustificato scientificamente) per le determinazioni LSC e UDS per ogni punto sperimentale.

Uso di controlli negativi e positivi

È opportuno includere in ciascun esperimento controlli simultanei positivi e negativi (non trattati e/o del solo veicolo), con e senza attivazione metabolica.

Esempi di controlli positivi per il test su epatociti di ratto sono il 7,12-DMBA (7,12-dimetilbenzatracene) e il 2-AAF (2-acetilaminofluorene). Nel caso delle linee cellulari stabilizzate un esempio di controllo positivo sia per le determinazioni autoradiografiche che per le determinazioni LSC effettuate senza attivazione metabolica è la 4-NQO (4-nitrochinolina-N-ossido); la N-dimetilnitrosamina è a sua volta un esempio di composto per controllo positivo quando sia fatto uso di sistemi di attivazione metabolica.

Concentrazioni

È opportuno fare uso di concentrazioni multiple della sostanza in esame in una gamma adeguata ai fini della determinazione della risposta. La concentrazione più elevata deve dar luogo a qualche effetto citotossico. I composti relativamente insolubili in acqua vanno saggiati fino al loro limite di solubilità. Per le sostanze non tossiche altamente solubili in acqua la concentrazione massima della sostanza in esame va determinata caso per caso.

Cellule

Per il mantenimento delle colture è opportuno fare uso di terreni di crescita, di concentrazioni di CO_2 e di condizioni di temperatura e di umidità appropriate. Le linee cellulari stabilizzate devono essere controllate periodicamente per escludere la presenza di contaminazione da micoplasma.

Attivazione metabolica

Con le colture primarie di epatociti non si fa uso di sistemi di attivazione metabolica. Le linee cellulari stabilizzate ed i linfociti vengono esposti alla sostanza in esame sia in presenza che in assenza di un sistema appropriato di attivazione metabolica.

Procedimento

Preparazione delle colture

Le linee cellulari stabilizzate vengono generate da coltura stock (ad esempio per tripsinizzazione o mediante separazione per scuotimento), seminate in recipienti di coltura a densità appropriata ed incubate a 37 °C.

Colture a breve termine di epatociti di ratto vengono preparate dando modo a epatociti dissociati di fresco in un terreno appropriato di attaccarsi alla superficie di crescita. Le colture di linfociti umani vengono preparate secondo tecniche appropriate.

Trattamento delle colture con la sostanza in esame

Epatociti primari di ratto

Gli epatociti di ratto isolati di fresco vengono trattati con la sostanza in esame in un terreno contenente ^{3}H-TdR per una durata appropriata. Al termine del periodo di trattamento le cellule vanno tolte mediante filtraggio dal terreno, risciacquate, fissate ed essiccate. I vetrini vanno immersi in emulsione autoradiografica (alternativamente si possono usare pellicole adatte), esposti, sviluppati, colorati ed enumerati.

Linee cellulari stabilizzate e linfociti

Tecniche autoradiografiche: Le colture di cellule vengono esposte alla sostanza in esame per una durata appropriata e successivamente trattate con ^{3}H-TdR. La durata sarà determinata dalla natura della sostanza, dall'attività del sistema metabolizzante e dal tipo delle cellule. Per rilevare il valore massimo di UDS, è opportuno aggiungere ^{3}H-TdR contemporaneamente alla sostanza all'esame, ovvero entro pochi minuti dall'esposizione alla sostanza stessa. La scelta fra i suddetti due procedimenti sarà fatta in relazione alla possibilità di interazioni fra la sostanza all'esame e ^{3}H-TdR.

Al fine di poter distinguere fra UDS e la replicazione semi-conservativa di DNA si può inibire quest'ultima, ad esempio facendo uso di un terreno deficiente di arginina, a basso contenuto di siero o con idrossiurea nel mezzo di coltura.

Misure LSC di UDS: Prima del trattamento con la sostanza in esame è opportuno bloccare nel modo che si è descritto sopra l'entrata delle cellule nella fase S. Le cellule vengono poi esposte alla sostanza in esame nel modo che si è descritto per l'autoradiografia. Al termine del periodo di incubazione si estrae il DNA dalle cellule e si determinano il contenuto totale di DNA e la misura della incorporazione di ^{3}H-TdR.

Occorre rilevare che quando si fa uso delle tecniche sopra descritte di linfociti umani, la soppressione della replicazione semi-conservativa di DNA non è necessaria in colture non stimolate.

Analisi

Determinazioni autoradiografiche

Nella determinazione di UDS nelle cellule in coltura non si contano i nuclei in fase S. È opportuno contare almeno 50 cellule per concentrazione. Le lastrine vanno codificate prima del conteggio. È opportuno contare su ciascuna piastrina diversi campi a caso interamente separati tra loro. Per la determinazione della quantità di incorporazione di ^{3}H-TdR nel citoplasma è bene contare nel citoplasma di ciascuna cellula conteggiata tre aree delle dimensioni del nucleo.

Determinazioni LSC

Nelle determinazioni LSC UDS occorre fare uso di un numero adeguato di colture per ogni concentrazione e per i controlli.

Tutti i risultati dovrebbero essere confermati in un esperimento indipendente.

2. DATI

I dati devono essere presentati in forma di tabelle.

2.1. Determinazioni autoradiografiche

Della entità dell'incorporazione di ^{3}H-TdR nel citoplasma e del numero dei granuli osservati nel nucleo delle cellule va presa nota separatamente.

Per descrivere la distribuzione dell'entità dell'incorporazione di ^{3}H-TdR nel citoplasma e del numero dei granuli per nucleo può essere fatto riferimento alla media, alla mediana ed al modo.

2.2. Determinazioni LSC

Per le determinazioni LSC, l'incorporazione di ^{3}H-TdR va indicata in termini di dpm/µg di DNA. Il valore medio di dpm/µg di DNA con la deviazione standard può essere usato per descrivere la distribuzione della incorporazione.

I dati devono essere valutati secondo metodi statistici appropriati.

3. RELAZIONE

3.1. Relazione sul saggio

Nella relazione sul saggio devono figurare, se possibile:

— cellule usate, densità e numero dei passaggi al momento del trattamento, numero delle colture di cellule,

— metodi usati per il mantenimento delle colture di cellule, con indicazione del terreno, della temperatura e della concentrazione di CO_2,

— sostanza in esame, veicolo, concentrazioni e ragioni della scelta delle concentrazioni usate nella determinazione,

— dettagli riguardanti i sistemi di attivazione metabolica,

— programmi di trattamento,

— controlli positivi e negativi,

— tecnica autoradiografica usata,

— procedimenti usati per bloccare l'entrata delle cellule nella fase S,

— procedimenti usati per l'estrazione di DNA e per la determinazione del contenuto totale di DNA nelle determinazioni LSC,

— relazione dose-risposta se del caso,

— valutazione statistica,

— discussione dei risultati,

— interpretazione dei risultati.

3.2. Valutazione ed interpretazione

Vedi introduzione generale, parte B.

4. RIFERIMENTI

Vedi introduzione generale, parte B.

SAGGIO DEGLI SCAMBI TRA CROMATIDI FRATELLI IN VITRO

1. METODO

1.1. Introduzione

Vedi introduzione generale, parte B.

1.2. Definizioni

Vedi introduzione generale, parte B.

1.3. Sostanze di riferimento

Nessuna.

1.4. Principi del metodo di saggio

Quello degli scambi tra cromatidi fratelli — Sister chromatid exchange (SEC) — è un test a breve termine per la rilevazione degli scambi reciproci di DNA fra due cromatidi fratelli di un cromosoma in duplicazione. Gli SCE rappresentano l'interscambio di prodotto della replicazione di DNA in corrispondenza di loci apparentemente omòloghi. Il processo di scambio comporta presumibilmente la rottura e la riunione di DNA, ma sulla sua base molecolare non si conosce in realtà molto. La rilevazione degli SCE richiede qualche mezzo per marcare in modo differenziale i cromatidi fratelli, e questo può essere ottenuto mediante incorporazione di bromodeossiuridina (BrdU) nel DNA cromosomico per due cicli cellulari.

Colture in vitro di cellule di mammiferi vengono esposte alla sostanza in esame con e senza un sistema esogeno di attivazione metabolica dei mammiferi, se appropriato, e poste in coltura per due cicli di replicazione in terreno contenente BrdU. Dopo un trattamento con un inibitore del fuso (ad esempio la colchicina) per accumulare cellule in uno stadio di mitosi di tipo metafasico (c-metafase), le cellule vengono raccolte e si procede alle preparazioni cromosomiche.

1.5. Criteri qualitativi

Nessuno.

1.6. Descrizione del metodo di saggio

Preparazioni

— Nel saggio si possono usare colture primarie (linfociti umani) o linee cellulari stabilizzate (ad esempio cellule di ovario di hamster cinese). Le linee cellulari devono essere controllate per escludere la presenza di contaminazione da Mycoplasma.

— Vanno usati terreni di coltura e condizioni di incubazione (temperatura, recipienti di coltura, concentrazione di CO_2 ed umidità) appropriati.

— Le sostanze in esame possono essere preparate in terreni di coltura ovvero disciolte o poste in sospensione in veicoli appropriati prima del trattamento delle cellule. La concentrazione finale dei veicoli nei sistemi di coltura non deve influire in maniera significativa sulla vitalità o sul tasso di crescita delle cellule, ed è parallelamente opportuno verificare la frequenza degli SCE per mezzo di un controllo con solvente.

— È opportuno esporre le cellule alla sostanza in esame sia in presenza che in assenza di un sistema esogeno di attivazione metabolica di mammiferi. Alternativamente, ove si faccia uso di tipi di cellule con attività metabolica endogena, l'intensità e la natura dell'attività devono essere appròpriate per la classe chimica sottoposta all'esame.

Condizioni sperimentali

Numero di colture

Per ciascun punto sperimentale dovrebbero essere usate colture almeno in duplicato.

Uso di controlli positivi e negativi

È opportuno includere in ciascun esperimento dei controlli positivi, facendo uso sia di un composto ad azione diretta che di un composto richiedente attivazione metabolica, ed è opportuno anche effettuare un controllo del veicolo.

Quali esempi di sostanze che si prestano ad essere usate come controlli positivi si possono citare:

- come composto ad azione diretta:
  - l'etilmetansulfonato,
- come composto ad azione indiretta:
  - la ciclofosfamide.

Se del caso, può essere incluso nell'esperimento un controllo positivo supplementare della medesima classe chimica della sostanza in esame.

Concentrazioni

È opportuno fare uso di almeno tre concentrazioni adeguatamente intervallate della sostanza in esame. La concentrazione più elevata deve dar luogo ad un effetto tossico significativo, ma deve ancora consentire il verificarsi di una replicazione adeguata delle cellule. Le sostanze relativamente insolubili in acqua vanno saggiate fino al loro limite di solubilità secondo procedimenti appropriati. Per le sostanze non tossiche altamente solubili in acqua la concentrazione massima della sostanza in esame va determinata caso per caso.

Procedimento

Preparazione delle colture

Linee cellulari stabilizzate vengono generate da colture stock (ad esempio per tripsinizzazione o mediante distacco per scuotimento), seminate in recipienti di coltura a densità appropriata ed incubate a 37 °C. Nel caso di coltura monostrato, il numero delle cellule per ogni recipiente di coltura va regolato in modo che le colture non siano confluenti in misura molto maggiore del 50% al momento della raccolta. Alternativamente, le cellule possono essere usate in forma di coltura in sospensione. Le colture di linfociti umani sono ottenute da sangue eparinizzato secondo tecniche appropriate ed incubate a 37 °C.

Trattamento

Vengono esposte alla sostanza in esame per una durata adeguata cellule in uno stadio di crescita esponenziale; nella maggior parte dei casi può essere efficace una durata da una a due ore, ma la durata del trattamento può in taluni casi essere prolungata fino a due cicli cellulari completi. Le cellule non aventi una sufficiente attività metabolica endogena vanno esposte alla sostanza in esame sia in presenza che in assenza di un sistema appropriato di attivazione metabolica. Al termine del periodo di esposizione le cellule vengono lavate da ogni traccia della sostanza in esame e coltivate per due cicli di replicazione in presenza di BrdU. In un procedimento alternativo si possono esporre le cellule contemporaneamente alla sostanza in esame e al BrdU per la durata completa di coltura di due cicli cellulari. Le colture di linfociti umani vengono trattate mentre si trovano in condizione semisincrona. Le cellule vengono analizzate alle loro seconda divisione dopo il trattamento, per assicurarsi che siano state esposte alla sostanza negli stadi più sensibili del ciclo cellulare. Tutte le colture alle quali si aggiunge BrdU, vanno manipolate nell'oscurità o in luce attenuata di lampade ad incandescenza fino al momento della raccolta delle cellule, allo scopo di ridurre per quanto possibile la fotolisi del DNA contenente BrdU.

Raccolta delle cellule

Le colture di cellule vengono trattate con un inibitore del fuso (ad esempio colchicina) da 1 a 4 ore prima della raccolta. Ciascuna coltura viene raccolta e trattata separatamente per la preparazione dei cromosomi.

Preparazione e colorazione dei cromosomi

I preparati di cromosomi vengono ottenuti secondo le tecniche citogenetiche correnti. La colorazione dei vetrini per l'evidenziazione degli SCE può essere effettuata secondo diverse tecniche (ad esempio con il metodo della fluorescenza più Giemsa).

Analisi

Il numero di cellule analizzate deve essere basato sulla frequenza spontanea di controllo degli SCE. Normalmente si analizzano per gli SCE almeno 25 metafasi ben spaziate per coltura. I vetrini vengono codificati prima dell'analisi. Nei linfociti umani si analizzano soltanto metafasi contenenti 46 centromeri. Nelle linee cellulari stabilizzate si analizzano a loro volta soltanto metafasi contenenti ± 2 centromeri del numero modale. È opportuno indicare se il salto di marcatura a livello del centromero viene o non viene conteggiato come SCE. I risultati dovrebbero essere confermati in un esperimento indipendente.

2. DATI

I dati devono essere presentati in forma di tabelle. Il numero degli SCE per metafase e il numero degli SCE per cromosoma vanno indicati separatamente per tutte le colture trattate e quelle di controllo. I dati devono essere definiti secondo metodi statistici appropriati.

3. RELAZIONE

3.1. Relazione sul saggio

Nella relazione sul saggio devono figurare, se possibile:

— cellule usate, metodi di mantenimento della coltura cellulare,

— condizioni sperimentali: composizione dei mezzi, concentrazione di CO_2, concentrazione della sostanza all'esame, veicolo usato, temperatura di incubazione, tempo di trattamento, inibitore del fuso usato, sua concentrazione e durata del trattamento connesso, tipo di sistema di attivazione di mammiferi usato, controlli positivi e negativi,

— numero di colture di cellule per punto sperimentale,

— dettagli della tecnica usata per la preparazione delle lastrine,

— numero delle metafasi analizzate (indicazione separata dei dati per ciascuna coltura),

— numero medio di SCE per cellula e per cromosoma (indicazione separata dei dati per ciascuna coltura),

— criteri per il riscontro degli SCE,

— criteri di selezione delle dosi,

— relazione dose/risposta se del caso,

— valutazione statistica,

— discussione dei risultati,

— interpretazione dei risultati.

3.2. Valutazione ed interpretazione

Vedi introduzione generale, parte B.

4. RIFERIMENTI

Vedi introduzione generale, parte B.

SAGGIO DEI LETALI RECESSIVI LEGATI AL SESSO: DROSOPHILA MELANOGASTER

1. METODO

1.1. Introduzione

Vedi introduzione generale, parte B.

1.2. Definizioni

Vedi introduzione generale, parte B.

1.3. Sostanze di riferimento

Nessuna.

1.4. Principi del metodo di saggio

Il saggio dei letali recessivi legati al sesso — sex-linked recessive lethal (SLRL) — nel quale è fatto uso della Drosophila melanogaster, permette di rilevare l'induzione sia di mutazioni puntiformi che di piccole delezioni nella linea germinale dell'insetto. Si tratta di un saggio capace di rivelare mutazioni in circa 800 loci sul cromosoma X; questa cifra rappresenta circa l'80 % di tutti i loci del cromosoma X; quest'ultimo rappresenta a sua volta circa un quinto dell'intero genoma aploide.

Le mutazioni nel cromosoma X nella D. melanogaster sono espresse fenotipicamente nei maschi portanti il gene mutante. Quando la mutazione è letale nella condizione emizigote, la sua presenza si desume dall'assenza di una delle due classi di discendenza maschile che sono normalmente prodotte da una femmina eterozigote. Il saggio SLRL si basa sulla disponibilità di cromosomi specificamente marcati.

1.5. Criteri qualitativi

Nessuno.

1.6. Descrizione del metodo di saggio

Preparazioni

Ceppi

Possono essere usati maschi di un ceppo ben definito di tipo selvatico e femmine del ceppo Muller-5. Possono altresì essere usati altri ceppi di femmine marcate in modo appropriato con cromosomi X multipli invertiti.

Sostanza in esame

Le sostanze in esame vanno disciolte in acqua. Le sostanze non solubili in acqua possono essere disciolte o poste in sospensione in solventi appropriati (ad esempio una miscela di etanolo e Tween-60 o 80), e successivamente diluite in acqua o in soluzione salina prima della somministrazione. È opportuno evitare quale solvente il dimetilsolfossido (DMSO).

Numero di animali

Il saggio va programmato con una sensibilità ed una potenza predeterminati. Sul numero di cromosomi trattati che devono essere analizzati influirà fortemente la frequenza delle mutazioni spontanee osservata nel controllo appropriato.

Vie di somministrazione

L'esposizione può essere orale, per iniezione o per esposizione a gas o a vapori. La somministrazione della sostanza in esame può essere fatta in forma di soluzione zuccherina. Se necessario, le sostanze possono essere disciolte in soluzione di NaCl allo 0,7 % ed iniettate nel torace o nell'addome.

Uso di controlli negativi e positivi

È opportuno includere nell'esperimento controlli negativi (del solvente) e positivi. Ove tuttavia siano disponibili appropriati dati storici di controllo del laboratorio, non sono necessari controlli concomitanti.

Concentrazioni

È opportuno fare uso di tre concentrazioni. Per una valutazione preliminare può essere fatto uso di una sola concentrazione della sostanza in esame, che può essere quella massima tollerata o quella che dà luogo ad una qualche indicazione di tossicità. Per le sostanze non tossiche è opportuno adottare l'esposizione alla concentrazione massima praticabile.

Procedimento

Maschi di tipo selvatico (di età da 3 a 5 giorni) vengono trattati con la sostanza in esame e accoppiati individualmente con un numero maggiore di femmine vergini dello stock Muller-5 o di altro stock marcato in maniera appropriata (con cromosomi X multipli invertiti). Le femmine vengono sostituite con vergini fresche ogni due, tre giorni così da coprire l'intero ciclo delle cellule germinali. Sulla prole di dette femmine viene effettuata l'analisi degli effetti letali corrispondenti agli effetti sullo sperma maturo, sugli spermatidi di stadio medio o avanzato, sugli spermatidi precoci, sugli spermatociti e sugli spermatogoni al momento del trattamento.

Le femmine eterozigoti F_1 degli incroci di cui sopra sono fatte accoppiare individualmente (ossia in ragione di una femmina per bottiglietta) con i loro fratelli. Nella generazione F_2 si procede su ciascuna coltura all'analisi dell'assenza di maschi del tipo selvatico. Se da una femmina F_1 appare essere derivata una coltura portante un letale nel cromosoma X dei genitori (ossia se non si osservano maschi con il cromosoma trattato) si devono mettere alla prova figlie di quella femmina con il medesimo genotipo per stabilire se la letalità si ripete nella generazione successiva.

DATI

I dati devono essere disposti in forma di tabelle con indicazione del numero dei cromosomi X saggiati, del numero dei maschi non fertili e del numero dei cromosomi letali per ciascuna concentrazione di esposizione e per ciascun periodo di accoppiamento per i singoli maschi trattati. Deve essere riportato per ciascun maschio il numero degli aggregati di differenti dimensioni. I risultati dei test devono essere confermati in un esperimento a parte.

Per la valutazione del saggio dei letali recessivi legati al sesso deve essere fatto uso di metodi statistici appropriati. L'agglomerazione di letali recessivi aventi origine da un medesimo maschio dev'essere considerata e valutata secondo criteri statistici appropriati.

3. RELAZIONE

3.1. **Relazione sul saggio**

Nella relazione sul saggio devono figurare, se possibile:

- stock: stock o ceppi di Drosophila usati, età degli insetti, numero dei maschi trattati, numero dei maschi sterili, numero di colture F_2 costituite, numero di colture F_2 senza progenie, numero di cromosomi portanti un letale individuati per ciascuno stadio delle cellule germinali,
- criteri per la definizione delle dimensioni dei gruppi trattati,
- condizioni di effettuazione del saggio: descrizione dettagliata dei programmi di trattamento e di campionatura, livelli di esposizione, dati della tossicità, controlli negativi (del solvente) e positivi, se del caso,
- criteri per il riscontro delle mutazioni letali,
- relazione esposizione/effetto se del caso,
- valutazione statistica,
- discussione dei risultati,
- interpretazione dei risultati.

3.2. Valutazione ed interpretazione

Vedi introduzione generale, parte B.

4. RIFERIMENTI

Vedi introduzione generale, parte B.

SAGGIO IN VITRO DI TRASFORMAZIONE DI CELLULE DI MAMMIFERO

1. METODO

1.1. Introduzione

Vedi introduzione generale, parte B.

1.2. Definizioni

Vedi introduzione generale, parte B.

1.3. Sostanze di riferimento

Nessuna.

1.4. Principi del metodo di saggio

Per la rilevazione di cambiamenti fenotipici in vitro indotti da sostanze chimiche associate con una trasformazione maligna in vivo può essere fatto uso di sistemi di coltura di cellule di mammiferi. Fra le cellule più largamente usate figurano le cellule C3H10T½, 3T3, SHE, le cellule di ratto Fisher; i saggi si fondano su cambiamenti della morfologia cellulare, sulla formazione di foci e sulla perdita della dipendenza da ancoraggio in agar semisolido. Esistono anche altri sistemi meno largamente usati i quali mettono in luce altri tipi di cambiamenti fisiologici o morfologici nelle cellule successivamente all'esposizione a sostanze chimiche carcinogene. Nessuno degli eventi finali dei test in vitro ha un legame meccanicistico accertato con il cancro. Alcuni fra i saggi sono in grado di evidenziare agenti promotori dei tumori. La citotossicità può essere determinata attraverso la misura dell'effetto della sostanza in esame sulla capacità di formazione di colonie (efficienza di clonaggio) o sul tasso di crescita delle colture. La misurazione della citotossicità ha lo scopo di stabilire se l'esposizione alla sostanza in esame abbia avuto carattere rilevante dal punto di vista tossicologico, ma non può essere usata per calcolare la frequenza della trasformazione in tutti i saggi poiché alcuni di essi possono comportare un'incubazione prolungata e/o un ripiastramento delle cellule.

1.5. Criteri qualitativi

Nessuno.

1.6. Descrizione del metodo di saggio

Preparazioni

Cellule

È disponibile tutta una varietà di linee cellulari o di cellule primarie, in relazione al saggio di trasformazione che si intende effettuare. Il ricercatore deve accertarsi che nel saggio che si sta effettuando le cellule presentino dopo esposizione a carcinogeni non l'appropriato cambiamento fenotipico, e che il saggio nel suo laboratorio sia di provata e documentata validità e attendibilità.

Terreni di coltura

Devono essere usati terreni di coltura e condizioni sperimentali appropriati per il saggio di trasformazione che si effettua.

Sostanza in esame

Le sostanze in esame possono essere preparate in mezzi di coltura ovvero disciolte o poste in sospensione in veicoli appropriati, prima del trattamento delle cellule. La concentrazione finale del veicolo nel sistema di coltura non deve influire sulla vitalità o sul tasso di crescita delle cellule né sull'incidenza della trasformazione.

Attivazione metabolica

Le cellule vanno esposte alla sostanza in esame sia in presenza che in assenza di un sistema esogeno di attivazione metabolica dei mammiferi. Alternativamente, quando sia fatto uso di tipi di cellule che possiedono un'attività metabolica endogena deve essere accertato che la natura dell'attività stessa sia appropriata per la classe chimica sottoposta all'esame.

Condizioni sperimentali

Uso di controlli positivi e negativi

È opportuno includere in ciascun esperimento dei controlli positivi, con impiego sia di un composto ad azione diretta che di un composto richiedente attivazione metabolica; è altresì opportuno fare uso di un controllo negativo (del solvente).

Quali esempi di sostanze che si prestano ad essere usate come controlli positivi si possono citare:

- sostanze ad azione diretta:
  - etilmetansulfonato,
  - β-propiolattone;
- composti richiedenti un'attivazione metabolica:
  - 2-acetilaminofluorene,
  - 4-dimetilaminoazobenzene,
  - 7,12-dimetilbenzantracene.

Se del caso, è opportuno includere un controllo positivo supplementare della medesima classe chimica del composto in esame.

Concentrazioni

È opportuno usare varie concentrazioni della sostanza in esame. Dette concentrazioni devono dar luogo ad un effetto tossico correlato con la concentrazione, nel senso che la concentrazione più elevata produce un livello ridotto di sopravvivenza, mentre alla concentrazione più bassa la sopravvivenza è approssimativamente dello stesso ordine che nel controllo negativo. Le sostanze relativamente insolubili in acqua vanno saggiate fino al loro limite di solubilità secondo procedure appropriate. Per le sostanze non tossiche altamente solubili in acqua la concentrazione massima della sostanza va determinata caso per caso.

Procedimento

L'esposizione delle cellule deve avere una durata appropriata in relazione al sistema di saggio adottato, e questo, quando l'esposizione è prolungata, può comportare un ridosaggio con cambio del mezzo e, se necessario, con miscela di attivazione metabolica fresca. Le cellule non aventi un'attività metabolica endogena sufficiente vanno esposte alla sostanza in esame sia in presenza che in assenza di un sistema di attivazione metabolica appropriato. Al termine del periodo di esposizione le cellule vengono lavate da ogni traccia della sostanza in esame e coltivate in condizioni appropriate per la comparsa del fenotipo trasformato che si sta studiando, e viene infine determinata l'incidenza della trasformazione. Tutti i risultati devono essere confermati in un esperimento indipendente.

2. DATI

I dati vanno presentati in forma di tabella e possono assumere forme diverse a seconda del tipo di determinazione effettuato, ad esempio numero di foci o di colonie per piastre, piastre positive o numero delle cellule trasformate. La sopravvivenza va espressa quale percentuale dei livelli di controllo, e la frequenza della trasformazione sotto forma del numero di trasformanti in relazione al numero dei sopravvissuti. I dati devono essere valutati secondo metodi statistici appropriati.

3. RELAZIONE

3.1. Relazione sul saggio

Nella relazione sul saggio devono figurare, se possibile:

- tipo di cellule usato, numero delle colture cellulari, metodi di mantenimento delle colture,
- condizioni di effettuazione del saggio, concentrazione della sostanza in esame, veicolo usato, temperatura di incubazione, durata dell'incubazione, durata e frequenza del trattamento, densità delle cellule durante il trattamento, tipo di sistema di attivazione metabolica esogena usato, controlli positivi e negativi, specificazione del fenotipo studiato, sistema selettivo usato (se del caso), criteri per la scelta delle dosi,

— metodo seguito per l'enumerazione delle cellule vitali e delle cellule trasformate,

— valutazione statistica,

— discussione dei risultati,

— interpretazione dei risultati.

3.2. Valutazione ed interpretazione

Vedi introduzione generale, parte B.

4. RIFERIMENTI

Vedi introduzione generale, parte B.

SAGGIO DEI LETALI DOMINANTI NEI RODITORI

1. METODO

1.1. Introduzione

Vedi introduzione generale, parte B.

1.2. Definizioni

Vedi introduzione generale, parte B.

1.3. Sostanze di riferimento

Nessuna.

1.4. Principi del metodo di saggio

Gli effetti dei letali dominanti provocano la morte dell'embrione o del feto. L'induzione di letali dominanti per effetto dell'esposizione ad una sostanza chimica indica che la sostanza in causa ha attaccato il tessuto germinale della specie all'esame. È generalmente ammesso che i letali dominanti sono dovuti a un danno cromosomico (anomalie strutturali e numeriche). La morte dell'embrione in femmine trattate può altresì essere il risultato di effetti tossici.

Come criterio generale si espongono animali maschi al composto in esame e si accoppiano i medesimi con femmine vergini non trattate. I diversi stadi delle cellule germinali possono essere saggiati separatamente mediante l'osservanza di intervalli in successione negli accoppiamenti. L'aumento degli impianti morti per femmina nel gruppo trattato in confronto con gli impianti morti per femmina nel gruppo di controllo rispecchia la perdita successiva all'impianto. La perdita anteriore all'impianto può essere stimata sulla base di conteggi dei corpi lutei oppure attraverso il raffronto del totale degli impianti per femmina nel gruppo trattato e in quello di controllo. L'effetto letale dominante complessivo è rappresentato dalla somma della perdita anteriore e successiva all'impianto. Il calcolo dell'effetto letale dominante complessivo si basa sul raffronto fra gli impianti vivi per femmina nel gruppo trattato e gli impianti vivi per femmina nel gruppo di controllo. Una riduzione del numero di impianti a determinati intervalli può essere il risultato dell'uccisione di cellule (vale a dire, di spermatociti e/o di spermatogoni).

1.5. Criteri qualitativi

Nessuno.

1.6. Descrizione del metodo di saggio

Preparazioni

In tutti i casi in cui ciò sia possibile, le sostanze in esame vanno disciolte o poste in sospensione in soluzione salina isotonica. Le sostanze non solubili in acqua possono essere disciolte o sospese in solventi appropriati. Il solvente usato non deve né interferire con la sostanza in esame né produrre effetti tossici. È opportuno fare uso di preparazioni fresche della sostanza in esame.

Condizioni sperimentali

Vie di somministrazione

Il composto in esame va in generale somministrato una sola volta. Sulla base di informazioni tossicologiche può essere adottato un programma di trattamento ripetuto. Le vie di somministrazione correnti sono l'intubazione orale e l'iniezione intraperitoneale. Possono altresì essere appropriate altre vie di somministrazione.

Animali da esperimento

Quali specie da sottoporre al saggio sono raccomandati i ratti o i topi. Animali sani nella piena maturità sessuale vengono randomizzati ed assegnati al gruppo per il trattamento e al gruppo di controllo.

Numero e sesso

Occorre fare uso di un numero adeguato di maschi trattati in modo da tener conto della variazione spontanea del carattere biologico di cui si effettua la valutazione. Il numero scelto deve essere basato sulla sensibilità di rilevazione e sul valore di significatività determinati in precedenza. Ad esempio, in un esperimento tipico, il numero dei maschi per ciascun gruppo/dose deve essere sufficiente per dare da 30 a 50 femmine gravide per ogni intervallo di accoppiamento.

Uso di controlli negativi e positivi

È opportuno in linea generale includere in ciascun esperimento dei controlli simultanei positivi e negativi (del veicolo). Quando siano disponibili risultati accettabili di controlli positivi relativi ad esperimenti effettuati di recente nel medesimo laboratorio, al posto di un controllo positivo simultaneo può essere fatto uso di detti risultati.

Le sostanze per i controlli positivi vanno usate a dosi opportunamente basse (ad esempio MMS, intraperitoneale, a 10 mg/kg) allo scopo di dimostrare la sensibilità del saggio.

Livelli delle dosi

Di norma va fatto uso di tre livelli di dosaggio. La dose più alta deve produrre segni di tossicità o di riduzione della fertilità negli animali trattati. In taluni casi può essere sufficiente un solo livello elevato di dosaggio.

Saggio del limite

Le sostanze non tossiche vanno saggiate a 5 g/kg con una sola somministrazione o a 1 g/kg/giorno con somministrazione ripetuta.

Procedimento

Sono possibili vari schemi di trattamento. Il tipo di trattamento più largamente usato è quello della somministrazione singola della sostanza in esame. Possono essere applicati anche altri schemi di trattamento.

I singoli maschi vengono accoppiati in successione con una o due femmine vergini non trattate ad intervalli appropriati dopo il trattamento. Le femmine vanno lasciate con i maschi almeno per la durata di un ciclo di estro o fino a che sia avvenuto l'accoppiamento, da determinare in base alla presenza di sperma nella vagina o di un tappo vaginale.

Il numero degli accoppiamenti successivi al trattamento è determinato in base al programma di trattamento e deve essere tale che vengano esaminati dopo il trattamento tutti gli stadi delle cellule germinali.

Le femmine vengono sacrificate nella seconda metà del periodo di gravidanza, e si procede all'esame del contenuto uterino per la determinazione del numero degli impianti morti e viventi. Si possono anche esaminare le ovaie per determinare il numero dei corpi lutei.

2. DATI

I dati devono essere disposti in forma di tabelle con indicazione del numero dei maschi, del numero delle femmine gravide e del numero delle femmine non gravide. I risultati di ciascun accoppiamento, con indicazione dell'identità dei singoli soggetti maschi e femmine, vanno riportati individualmente. Per ciascuna femmina va indicata la settimana di accoppiamento, e per i maschi il livello di dosaggio, nonché rispettivamente le frequenze degli impianti vivi e degli impianti morti. Il calcolo dell'effetto complessivo letale dominante si basa sul raffronto fra gli impianti vivi per femmina nel gruppo sottoposto al saggio e gli impianti vivi per femmina nel gruppo di controllo. Il rapporto fra gli impianti morti e quelli vivi del gruppo trattato posto a raffronto con il rapporto corrispondente del gruppo di controllo viene analizzato ai fini dell'indicazione della perdita successiva all'impianto.

Se i dati sono registrati come morti precoci e morti tardive, ciò deve risultare dalle tabelle. Se la perdita anteriore all'impiantazione è stimata, ne deve essere dato ragguaglio. La perdita anteriore all'impianto può essere calcolata come discrepanza fra il numero dei corpi lutei e il numero degli impianti, ovvero come riduzione del numero medio di impianti per utero in confronto con gli accoppiamenti di controllo. I dati vengono valutati secondo metodi statistici appropriati.

3. RELAZIONE

3.1. Relazione sul saggio

Nella relazione sul saggio devono figurare, se possibile:

— specie, ceppo, età e peso degli animali usati, numero degli animali dell'uno e dell'altro sesso nei gruppi sottoposti al saggio e nei gruppi di controllo,

— sostanza in esame, solvente, livelli di dosaggio saggiati e ragioni della scelta delle dosi, controlli negativi e positivi, dati della tossicità,

— via e durata dell'esposizione,

— ordine degli accoppiamenti,

— metodo usato per stabilire l'avvenuto accoppiamento,

— metodo del sacrificio,

— criteri per l'analisi dei letali dominanti,

— relazione dose/risposta, se del caso,

— valutazione statistica,

— discussione dei risultati,

— interpretazione dei risultati.

3.2. Valutazione ed interpretazione

Vedi introduzione generale, parte B.

4. RIFERIMENTI

Vedi introduzione generale, parte B.

ANALISI CITOGENETICA DELLE CELLULE GERMINALI: MAMMIFERI

1. METODO

1.1. Introduzione

Vedi introduzione generale, parte B.

1.2. Definizioni

Vedi introduzione generale, parte B.

1.3. Sostanze di riferimento

Nessuna.

1.4. Principi del metodo di saggio

Il saggio dell'analisi citogenetica in vivo qui considerato permette di rilevare aberrazioni strutturali dei cromosomi negli spermatogoni. Esso consiste in un'analisi delle mitosi degli spermatogoni per aberrazioni di tipo cromatidico e di tipo cromosomico.

Il saggio fa uso di preparati di testicoli di mammiferi esposti alle sostanze in esame per vie appropriate e sacrificati ad intervalli diversi. Prima di essere sacrificati gli animali sono altresì trattati con inibitori del fuso quali la colchicina in modo da far accumulare cellule ad uno stadio della mitosi di tipo metafasico (c-metafase). Si producono preparati cromosomici essicati all'aria, che vengono colorati ed analizzati al microscopio.

Utili informazioni supplementari possono essere fornite dall'analisi degli spermatociti allo stadio di diacinesi/metafase I per formazioni multivalenti da traslocazione dopo trattamento delle cellule staminali.

1.5. Criteri qualitativi

Nessuno.

1.6. Descrizione del metodo di saggio

Preparazioni

Le sostanze in esame vengono disciolte in soluzione salina isotonica. Le sostanze non solubili vengono disciolte o poste in sospensione in un solvente appropriato. Si devono usare soluzioni del composto in esame preparate di fresco. Se si fa uso di un solvente per facilitare il dosaggio, esso non deve interferire con la sostanza in esame né produrre effetti tossici.

Vie di somministrazione

I composti in esame vanno in genere somministrati una sola volta. Sulla base di informazioni tossicologiche può essere adottato un programma di trattamento ripetuto. Il trattamento ripetuto può tuttavia essere applicato soltanto se il composto in esame non presenta effetti citotossici nella differenziazione degli spermatogoni.

Le vie di somministrazione correnti sono la via orale e l'iniezione intraperitoneale. Possono altresì essere appropriate altre vie di somministrazione.

Animali da esperimento

È per lo più fatto uso di topi e di hamster cinesi. Può tuttavia essere impiegata qualsiasi altra specie di mammiferi.

Vengono utilizzati maschi sessualmente maturi, che sono assegnati a caso ai gruppi per il trattamento ed ai gruppi di controllo.

Numero degli animali

Si devono usare almeno 5 maschi per ciascun gruppo trattato e per ciascun gruppo di controllo.

Uso di controlli negativi e positivi

In linea generale è opportuno includere in ciascun esperimento dei controlli simultanei positivi e negativi (del solvente).

Le sostanze per i controlli positivi vanno usate in dose opportunamente bassa (ad esempio la mitomicina C, intraperitoneale, a 0,3 mg/kg) in modo da dimostrare la sensibilità del saggio.

Livelli di dose

Si fa uso di una sola dose del composto in esame, scegliendo a questo fine la dose massima tollerata ovvero quella che produce qualche indicazione di citotossicità. Se la dose iniziale uccide un gran numero di cellule, si deve usare una seconda dose più bassa che presenti citotossicità. Nei casi in cui è necessario stabilire una relazione dose/risposta, sono richieste almeno tre dosi (ad esempio per confermare una risposta positiva debole). Le sostanze non tossiche vanno saggiate alla dose praticabile più elevata sia per la somministrazione singola che per la somministrazione ripetuta.

Procedimento

Gli animali vengono in generale trattati con il composto in esame un'unica volta. Per il gruppo con la dose più elevata sono usati tre intervalli di campionamento dopo il trattamento. L'intervallo per il campionamento centrale è di 24 ore. Poiché il composto in esame può influire sulla cinetica del ciclo cellulare, si applicano un primo intervallo per la campionatura ed uno successivo adeguatamente spaziati in un lasso di tempo da 6 a 48 ore. Per i livelli di dosaggio supplementari i campioni vanno presi all'intervallo specificamente sensibile ovvero, quando questo non sia noto, 24 ore dopo il trattamento.

Nel caso di un programma di trattamento ripetuto, può essere fatto uso di dosaggi ripetuti, e in tal caso i campioni vanno presi da 6 a 24 ore dopo l'ultimo trattamento. Un singolo tempo di campionamento può essere usato se giustificato scientificamente.

Preparazione del testicolo

Per l'analisi della mitosi degli spermatogoni si inietta agli animali per via intraperitoneale una dose adeguata di un inibitore del fuso come la colchicina. Gli animali vengono poi sacrificati ad un intervallo appropriato dopo il trattamento. Per i topi detto intervallo varia da 3 a 5 ore, mentre per gli hamster cinesi possono essere necessarie più di 5 ore.

È fatto uso della tecnica di essiccazione all'aria. Per specie diverse possono rendersi necessarie modifiche del procedimento standard. Si ottengono sospensioni di cellule che vengono trattate con soluzione ipotonica e fissate. Le cellule vengono stese su vetrini e colorate. I vetrini vengono codificati prima dell'analisi microscopica.

Analisi

Per la ricerca delle aberrazioni strutturali dei cromosomi si analizzano almeno 100 metafasi mitotiche largamente disperse con il numero completo di centromeri. In aggiunta a ciò si può determinare il rapporto fra le mitosi degli spermatogoni e la prima e la seconda metafase meiotica in un campione complessivo di 100 cellule in divisione per animale per mettere in luce un eventuale effetto citotossico.

2. DATI

I dati vengono presentati in forma di tabelle. Per ogni animale trattato e di controllo tutti i tipi di aberrazioni vengono elencati separatamente. È inclusa l'indicazione del numero totale di cellule analizzate e del numero totale di cellule aberranti per gruppo. Vengono date per tutti i parametri le medie e la deviazione standard. Si riporta infine in forma di tabelle il rapporto medio fra la mitosi degli spermatogoni e la prima e la seconda metafase meiotica per ciascun gruppo trattato e ciascun gruppo di controllo. I dati vengono valutati secondo metodi statistici appropriati.

3. **RELAZIONE**

3.1. **Relazione sul saggio**

Nella relazione sul saggio devono figurare, se possibile:

— specie e ceppo di animali maschi, età e peso degli animali,
— numero di animali per ciascun gruppo trattato e ciascun gruppo di controllo,
— condizione di effettuazione del saggio, descrizione particolareggiata del trattamento, livelli di dosaggio, solvente, inibitore del fuso usato,
— numero delle cellule analizzate per animale in ciascun gruppo,
— tipi e numero di aberrazioni separatamente per ciascun animale trattato e ciascun animale di controllo,
— valutazione statistica,
— discussione dei risultati,
— interpretazione dei risultati.

3.2. **Valutazione ed interpretazione**

Vedi introduzione generale, parte B.

4. **RIFERIMENTI**

Vedi introduzione generale, parte B.

SAGGIO DELLE MACCHIE (SPOT TEST): TOPI

1. METODO

1.1. Introduzione

Vedi introduzione generale, parte B.

1.2. Definizioni

Vedi introduzione generale, parte B.

1.3. Sostanze di riferimento

Nessuna.

1.4. Principi del metodo di saggio

Quello qui considerato è un saggio in vivo nei topi, nel quale vengono esposti alle sostanze chimiche degli embrioni in corso di sviluppo. Le cellule-bersaglio negli embrioni in corso di sviluppo sono i melanoblasti e i geni-bersaglio sono quelli che governano la pigmentazione del pelame dell'animale. Gli embrioni in corso di sviluppo sono eterozigoti per una serie di detti geni della colorazione del mantello. Una mutazione nell'allele dominante di un gene di questo tipo in un melanoblasto, o la sua perdita (tramite diversi eventi genetici) ha come risultato l'espressione del fenotipo recessivo nelle sue cellule discendenti, costituita da una macchia di colore cambiato nel mantello del topo risultante. Si riporta quindi il numero della prole con dette macchie o mutazioni, e se ne raffronta la frequenza con quella riscontrata nella prole risultante da embrioni trattati soltanto con il solvente. Il saggio delle macchie (Spot test) nei topi rivela presunte mutazioni somatiche nelle cellule fetali.

1.5. Criteri qualitativi

Nessuno.

1.6. Descrizione del metodo di saggio

Preparazioni

Quando ciò è possibile, le sostanze in esame vengono disciolte o poste in sospensione in soluzione salina isotonica. Le sostanze non solubili in acqua vengono disciolte o poste in sospensione in solventi appropriati. Il solvente usato non deve interferire con la sostanza in esame né produrre effetti tossici. È opportuno usare preparazioni fresche della sostanza in esame

Animali da esperimento

Si accoppiano topi del ceppo T (nonagouti, a/a; chinchilla, pink eye, $c^{ch}p/c^{ch}p$; brown, b/b; dilute, short ear, d se/d se; piebald spotting, s/s) con il ceppo HT (pallid, nonagouti, brachypody, pa a bp/pa a bp; leaden fuzzy, ln fz/ln fz; pearl pe/pe) o con C57 BL (nonagouti, a/a). Possono essere usati anche altri incroci appropriati, ad esempio fra NMRI (nonagouti; a/a; albino, c/c) e DBA (nonagouti, a/a; brown, b/b; dilute d/d), a condizione che producano prole nonagouti.

Numero e sesso

Viene trattato un numero di femmine gravide sufficiente per ottenere un numero appropriato di prole sopravvivente per ciascun livello di dosaggio usato. Le dimensioni appropriate del campione sono determinate dal

numero delle macchie osservate nei topi trattati e dalla scala dei dati di controllo. Un risultato negativo è accettabile soltanto quando si siano riscontrati almeno 300 figli di femmine trattate con la dose più alta.

Controlli positivi e negativi

È opportuno che siano disponibili dati di controllo simultanei ottenuti su topi trattati soltanto con il solvente (controlli negativi). Eventuali dati storici di controllo del medesimo laboratorio possono essere messi insieme con i dati di controllo nuovi in modo da accrescere la sensibilità del saggio, a condizione che essi siano omogenei. Se non si rileva alcuna mutagenicità per la sostanza in esame, dovrebbero essere disponibili dati di controllo positivo ottenuti di recente nel medesimo laboratorio in seguito a trattamento con una sostanza della quale sono noti gli effetti di mutagenicità con questo saggio.

Vie di somministrazione

Le vie abituali di somministrazione sono l'intubazione orale e l'iniezione intraperitoneale delle femmine gravide. Nei casi in cui ciò possa essere appropriato, si fa uso anche del trattamento per inalazione o di altre vie di somministrazione.

Livelli di dose

Si fa uso di almeno due livelli di dose, con uno dei livelli che dà luogo a segni di tossicità o ad una riduzione delle proporzioni della figliata. Per le sostanze non tossiche è opportuno ricorrere all'esposizione alla dose massima praticabile.

Procedimento

Viene di norma praticato un unico trattamento nel giorno 8, 9 o 10 di gravidanza, contando come giorno 1 quello in cui si è osservato per la prima volta il tappo vaginale. Detti giorni corrispondono a 7,25, 8,25 e 9,25 giorni dopo il concepimento. Possono essere praticati trattamenti successivi nel corso di detti giorni.

Analisi

La prole viene codificata e nel periodo fra tre o quattro settimane dopo la nascita si effettua su di essa l'analisi delle macchie pigmentale. Si distinguono tre categorie di macchie:

a) macchie bianche a distanza fino a 5 mm dalla linea ventrale mediana che si presume derivino dall'uccisione di cellule (WMVS),

b) macchie gialle di tipo aguti, associate con le mammelle, gli organi genitali, le zone della gola, delle ascelle e dell'inguine e la parte mediana della fronte, che si presume derivino da difettoso differenziamento (MDS),

c) macchie pigmentate e bianche distribuite in disordine sul manto, che si presume derivino da mutazioni somatiche (RS).

Devono essere osservate tutte e tre le categorie, ma ha rilevanza genetica soltanto l'ultima, RS. Eventuali problemi per quel che riguarda la distinzione fra MDS e RS possono essere risolti mediante microscopia fluorescente di peli presi come campione.

Va presa nota di evidenti anomalie morfologiche grossolane della prole.

2. DATI

I dati vengono presentati sotto forma del numero totale dei discendenti esaminati e del numero dei discendenti che hanno una o più macchie da mutazione somatica presunta. I dati relativi al trattamento ed al controllo negativo vengono posti a raffronto secondo metodi statistici appropriati. I dati sono anche presentati su base per prole.

3. RELAZIONE

3.1. Relazione sul saggio

Nella relazione sul saggio devono figurare, se possibile:

- ceppi usati nell'incrocio,
- numero di femmine gravide nei gruppi trattati e nei gruppi di controllo,
- dimensioni medie delle figliate nei gruppi trattati ed in quelli di controllo alla nascita ed allo svezzamento,
- livelli di dose della sostanza in esame,
- solvente usato,

- giorno di gravidanza al quale è stato praticato il trattamento,
- vie di somministrazione del trattamento,
- numero complessivo dei discendenti esaminati, e numero dei discendenti con WMVS, MDS e RS nei gruppi trattati e in quelli di controllo,
- anomalie morfologiche grossolane,
- relazione dose/risposta di RS quando ciò sia possibile,
- valutazione statistica,
- discussione dei risultati,
- interpretazione dei risultati.

3.2. Valutazione ed interpretazione

Vedi introduzione generale, parte B.

4. RIFERIMENTI

Vedi introduzione generale, parte B. .

TRASLOCAZIONI EREDITABILI: TOPO

1. METODO

1.1. Introduzione

Vedi introduzione generale, parte B.

1.2. Definizioni

Vedi introduzione generale, parte B.

1.3. Sostanze di riferimento

Nessuna.

1.4. Principi del metodo di saggio

Il saggio delle traslocazioni ereditabili nel topo rivela cambiamenti strutturali e numerici dei cromosomi nelle cellule germinali di mammiferi quali sono recuperate nella progenie della prima generazione. I tipi di mutazioni cromosomiche sono delle traslocazioni reciproche e, se è compresa progenie femminile, la perdita del cromosoma X. I portatori di traslocazione e le femmine XO presentano fertilità ridotta e di ciò è fatto uso per la selezione di progenie F_1 per l'analisi citogenetica. Taluni tipi di traslocazioni (autosoma-X e tipo c-t) provocano sterilità completa. Le traslocazioni sono citogeneticamente osservabili in cellule meiotiche alla diacinesi della metafase I di individui di sesso maschile, che sono o maschi F_1 o figli di femmine F_1. Le femmine XO sono identificate citogeneticamente dalla presenza di 39 cromosomi soltanto nelle mitosi del midollo osseo.

1.5. Criteri qualitativi

Nessuno.

1.6. Descrizione del metodo di saggio

Preparazioni

Le sostanze chimiche in esame vengono disciolte in soluzione salina isotonica. Se insolubili esse vengono disciolte o poste in sospensione in solventi appropriati. È fatto uso di soluzioni della sostanza in esame preparate di fresco.

Se si fa uso di un solvente per facilitare il dosaggio, esso non deve interferire con il composto in esame né dar luogo ad effetti tossici.

Vie di somministrazione

Le vie di somministrazione sono solitamente l'intubazione orale o l'iniezione intraperitoneale. Possono essere appropriate altre vie di somministrazione.

Animali da esperimento

Per la facilità della riproduzione e della verifica citologica, gli esperimenti in questione vengono effettuati sui topi. Non è necessario alcun ceppo di topi specifico. Tuttavia, nell'effettuazione di prove riguardanti la fertilità è opportuno che le dimensioni medie della figliata del ceppo usato siano di più di 8 neonati e siano inoltre relativamente costanti. Sono usati animali sani sessualmente maturi.

Numero di animali

Il numero degli animali occorrenti dipende dalla frequenza delle traslocazioni spontanee, e dal tasso minimo di induzione necessario per un risultato positivo. Il saggio si effettua normalmente mediante analisi della progenie maschile F_1. È opportuno esaminare almeno 500 capi di progenie maschile F_1 per ciascun gruppo/dose. Se si include progenie femminile F_1, occorrono 300 maschi e 300 femmine.

Uso di controlli negativi e positivi

Dovrebbero essere disponibili dati adeguati di controllo, derivati da controlli simultanei o storici. Qualora siano disponibili dati accettabili di controllo positivo da esperimenti condotti di recente nello stesso laboratorio, questi risultati possono essere usati in luogo del controllo positivo simultaneo.

Livelli di dose

Si sperimenta un solo livello di dose, ossia solitamente la dose più alta associata con la produzione dei minimi effetti tossici, ma senza che sia influenzato il comportamento riproduttivo o la sopravvivenza. Per stabilire una relazione dose/risposta sono necessarie due dosi supplementari più basse. Per le sostanze non tossiche è opportuno adottare un'esposizione alla dose massima praticabile.

Procedimento

Trattamento e accoppiamento

Sono possibili due schemi di trattamento. Nello schema più largamente usato è praticata un'unica somministrazione della sostanza in esame. Si può tuttavia procedere anche all'applicazione della sostanza in esame 7 giorni per settimana per 35 giorni. Il numero degli accoppiamenti successivi al trattamento è determinato dal programma di trattamento adottato, e deve essere stabilito in modo che siano considerati tutti gli stadi delle cellule germinali trattate. Al termine del periodo di accoppiamento, le femmine vengono tenute in gabbie individuali. Quando le femmine partoriscono, si prende nota della data, del numero e del sesso della progenie. Tutta la progenie maschile viene svezzata, mentre tutta la progenie femminile viene scartata, salvo nel caso che la si includa nell'esperimento.

Controllo della eterozigosi di traslocazione

È praticato l'uno o l'altro di due metodi possibili:

— analisi della fertilità della progenie F_1 e successiva verifica degli eventuali portatori di traslocazione mediante analisi citogenetica;

— analisi citogenetica di tutta la progenie maschile F_1 senza selezione preliminare mediante analisi della fertilità.

a) Analisi della fertilità

La diminuzione della fertilità di un individuo F_1 può essere stabilita attraverso l'osservazione delle dimensioni della figliata e/o dell'analisi del contenuto uterino delle femmine accoppiate.

Devono essere stabiliti dei criteri specifici per la determinazine della fertilità normale e della fertilità diminuita nel ceppo di topi usato.

Osservazione dell'entità delle figliate: i maschi F_1 da sottoporre al saggio vengono posti in gabbia individualmente con femmine del medesimo esperimento o della colonia. Le gabbie vengono ispezionate giornalmente a partire da 18 giorni dopo l'accoppiamento. Viene presa nota alla nascita dell'entità della figliata e del sesso dalla progenie F_2 e le figliate vengono successivamente scartate. Se si sottopone al saggio la progenie femminile F_1, si tiene la progenie F_2 di piccole figliate per un'ulteriore sperimentazione. Le portatrici femmine di traslocazioni sono verificate mediante analisi citogenetica di una traslocazione in uno qualsiasi dei loro discendenti maschi. Le femmine XO si riconoscono dal cambiamento del rapporto fra i sessi nella loro progenie (maschi/femmine da 1:1 a 1:2). In un procedimento in serie si escludono gli animali F_1 normali da sperimentazioni ulteriori se la prima figliata F_2 raggiunge o supera un valore normale predeterminato, altrimenti si osserva una seconda o una terza figliata F_2. Gli animali F_1 che non possono essere classificati come normali dopo l'osservazione di un numero di figliate F_2 fino a tre vengono saggiati ulteriormente mediante l'analisi del contenuto uterino delle femmine con essi accoppiate, oppure sono direttamente sottoposti all'analisi citogenetica.

Analisi del contenuto uterino: la diminuzione dell'entità delle figliate nei portatori di traslocazioni è dovuta a morte dell'embrione, e di conseguenza un numero elevato di impianti morti è indicativo della presenza di una traslocazione nell'animale all'esame. I maschi F_1 da sottoporre al saggio vengono accoppiati con due, tre femmine ciascuno. Il concepimento viene determinato mediante ispezione giornaliera per l'osservazione di tappi vaginali fra le 8 e le 10 antimeridiane. Le femmine vengono uccise da 14 a 16 giorni dopo e viene presa nota degli impianti sia vivi che morti nei loro uteri.

b) Analisi citogenetica

Si allestiscono preparati di testicoli con la tecnica dell'essiccazione in aria. I portatori di traslocazioni sono identificati in base alla presenza di configurazioni multivalenti alla diacinesi di metafase I degli spermatociti primari. L'osservazione di almeno due cellule con associazione multivalente costituisce la prova occorrente che l'animale sottoposto al saggio è un portatore di traslocazione.

Se non si è proceduto ad alcuna selezione nell'allevamento, sono esaminati citogeneticamente tutti i maschi F_1. Deve essere riscontrato al microscopio un minimo di 25 diacinesi metafasi I per maschio. Per i maschi F_1 con testicoli piccoli e con degradazione meiotica prima della diacinesi e per le femmine F_1 sospette di XO è necessario l'esame delle metafasi mitotiche, degli spermatogoni o del midollo osseo. La presenza di un cromosoma insolitamente lungo e/o corto in ognuna di 10 cellule è il segno di una traslocazione particolare sterile del maschio (tipo c-t). Talune traslocazioni di autosoma X che provocano la sterilità del maschio possono essere identificate soltanto raggruppando l'analisi dei cromosomi mitotici. La presenza di 39 cromosomi nella totalità di 10 mitosi è il segno di una condizione di XO in una femmina.

2. DATI

I dati sono presentati in forma di tabelle. Sono riportati l'entità media delle figliate e il rapporto fra i sessi dagli accoppiamenti dei genitori alla nascita e allo svezzamento per ciascun intervallo di accoppiamento.

Per la valutazione della fertilità degli animali F_1 sono presentate le entità medie delle figliate di tutti gli accoppiamenti normali e le entità delle figliate singole dei portatori di traslocazioni F_1. Per l'analisi del contenuto uterino è dato ragguaglio del numero medio degli impianti vivi e morti degli accoppiamenti normali e del numero individuale degli impianti vivi e morti per ciascun accoppiamento di portatori di traslocazione F_1.

Per l'analisi citogenetica della diacinesi metafase I sono elencati per ciascun portatore di traslocazione il numero di tipi di configurazioni multivalenti ed il numero totale delle cellule.

Per gli individui F_1 sterili sono riportati il numero totale degli accoppiamenti e la durata del periodo di accoppiamento. Sono forniti i pesi dei testicoli e dettagli delle analisi citogenetiche.

Per le femmine XO sono riportati l'entità media delle figliate, il rapporto fra i sessi della progenie F_2 e i risultati dell'analisi citogenetica.

Se possibile i portatori di traslocazioni vengono preselezionati per mezzo di analisi della fertilità: le tabelle devono in tal caso recare l'indicazione del numero di soggetti così selezionati che sono risultati eterozigoti di traslocazione confermati.

Sono parimenti riportati i dati dei controlli negativi e degli esperimenti di controllo positivo.

3. RELAZIONE

3.1. Relazione sul saggio

Nella relazione sul saggio devono figurare, se possibile:

- ceppo dei topi, età degli animali, pesi degli animali trattati,
- numero di animali genitori dell'uno e dell'altro sesso nei gruppi sottoposti al saggio e nei gruppi di controllo,
- condizioni di effettuazione del saggio, descrizione particolareggiata del trattamento, livelli di dosaggio, solventi, programmi di accoppiamento,
- numero e sesso dei piccoli nati per femmina, numero e sesso dei piccoli allevati per l'analisi della traslocazione,
- tempo e criteri dell'analisi della traslocazione,
- numero e descrizione particolareggiata dei portatori di traslocazioni ivi compresi i dati riguardanti la procreazione e i dati sul contenuto uterino, se del caso,
- procedimenti citogenetici e dettagli delle analisi microscopiche, di preferenza con illustrazioni,
- valutazione statistica,
- discussione dei risultati,
- interpretazione dei risultati.

3.2. Valutazione ed interpretazione

Vedi introduzione generale, parte B.

4. RIFERIMENTI

Vedi introduzione generale, parte B.

PARTE C: METODI PER LA DETERMINAZIONE DELLA ECOTOSSICITÀ

INTRODUZIONE GENERALE: PARTE C

I metodi di prova di seguito descritti servono alla determinazione di alcune proprietà ecotossicologiche enumerate nell'allegato VIII della direttiva 79/831/CEE. Il notificatore deve tener presente che i metodi per la determinazione delle seguenti proprietà previste al livello 1 dell'allegato VIII non sono inclusi nel testo:

— studio di tossicità prolungata sulla Daphnia magna,

— prova su una pianta superiore,

— studio di tossicità prolungata su un pesce,

— prova di accumulazione in una specie.

Quando opportuni metodi di prova per la determinazione di queste proprietà saranno ultimati, saranno pubblicati sotto forma di un ulteriore adeguamento al progresso tecnico. Nel frattempo il notificatore deve applicare metodi opportuni, internazionalmente riconosciuti, che devono essere specificati all'autorità competente.

SAGGIO DI INIBIZIONE DELLA CRESCITA ALGALE

1. METODO

1.1. Introduzione

Il presente saggio ha lo scopo di determinare gli effetti di una sostanza sulla crescita di una specie di alghe verdi unicellulari.

Saggi relativamente brevi consentono di valutare gli effetti su diverse generazioni. Questo metodo può essere adatto per varie specie di alghe unicellulari, nel qual caso il metodo seguito deve essere descritto nella relazione.

Il presente metodo si applica soprattutto a sostanze idrosolubili che, nelle condizioni sperimentali del saggio, hanno tendenza a restare nella fase acquosa.

Per sostanze con limitata solubilità nel mezzo utilizzato per il saggio, non è a volte possibile determinare quantitativamente la EC_{50} (vedi, più avanti, le definizioni).

Il metodo può essere usato per quelle sostanze che non interferiscono direttamente con la misurazione della crescita delle alghe.

Per l'esecuzione del saggio potrebbero essere utili le seguenti informazioni:

- idrosolubilità,
- tensione di vapore,
- formula di struttura,
- grado di purezza della sostanza,
- stabilità chimica in acqua ed alla luce,
- metodi di analisi per la determinazione quantitativa della sostanza in acqua,
- valore del pK_a,
- coefficiente di ripartizione n-ottanolo/acqua,
- risultati di un saggio di rapida biodegradabilità.

1.2. Definizioni e unità

Concentrazione cellulare: il numero di cellule per ml.

Crescita: l'incremento della concentrazione cellulare nel periodo del saggio.

Velocità di crescita: l'incremento della concentrazione cellulare per unità di tempo.

EC_{50}: in questo metodo, la concentrazione di sostanza in esame che produce un abbassamento del 50 % della crescita o della velocità di crescita rispetto al controllo.

NOEC (concentrazione priva di effetti osservati): in questo metodo, la più elevata concentrazione saggiata alla quale il parametro(i) misurato(i) non mostra(no), alcuna inibizione significativa della crescita, rispetto ai valori del controllo.

1.3. Sostanze di riferimento

Per evidenziare eventuali condizioni di saggio non soddisfacenti si può saggiare, come mezzo, una sostanza di riferimento. In tal caso i risultati andrebbero riportati nella relazione. Come sostanza di riferimento si può usare il dicromato di potassio.

1.4. Principio del metodo

Colture di selezionate alghe verdi, nella fase di crescita esponenziale, vengono esposte a diverse concentrazioni della sostanza in esame per un periodo di tempo corrispondente a varie generazioni ed in condizioni ben definite. Si determina quindi l'inibizione della crescita rispetto ad una coltura di controllo durante un periodo stabilito.

1.5. **Criteri di qualità**

1.5.1. ***Condizioni per la validità del saggio***

La concentrazione cellulare nelle colture di controllo dovrebbe subire, entro tre giorni, un incremento di un fattore non inferiore a 16.

La scomparsa della sostanza in esame dall'acqua, per trasferimento nella biomassa, non invalida necessariamente il saggio.

1.6. **Procedimento**

1.6.1. ***Preparazioni***

1.6.1.1. Attrezzatura e materiali

- Normale attrezzatura da laboratorio.
- Beute da saggio di determinato volume (per esempio, se il volume della soluzione in esame è di 100 ml, sono adatte beute da 250 ml).
- Attrezzatura per colture: armadio o camera in cui sia possibile mantenere una temperatura compresa fra 21 e 25 °C, costante entro ± 2 °C e che sia illuminata in modo uniforme e continuo nella regione spettrale compresa fra 400 e 700 nm. (si raccomanda un flusso quantico compreso entro ± 20% di 0,72 × 10^{20} fotoni/m^2 s. Questo flusso quantico è pari a 120 $\mu E/m^2 s$ e può essere ottenuto con comuni lampade fluorescenti del tipo bianco (luce-temperatura di circa 4 200 K) che producono circa 8 000 lux misurati con un collettore sferico).
- Apparecchiatura per determinare le concentrazioni cellulari (per esempio, contatore elettronico di particelle, microscopio con camera di conteggio, fluorimetro, spettrofotometro, colorimetro).

  Nota: Quando si usa uno spettrofotometro, per effettuare misure attendibili a basse concentrazioni cellulari, può essere necessario impiegare cuvette con cammino ottico di almeno 4 cm.

1.6.1.2. Soluzione di coltura per le alghe

Si raccomandano le seguenti soluzioni:

NH_4Cl:	15	mg/l
$MgCl_2.6H_2O$:	12	mg/l
$CaCl_2.2H_2O$:	18	mg/l
$MgSO_4.7H_2O$:	15	mg/l
KH_2PO_4:	1,6	mg/l
$FeCl_3.6H_2O$:	0,08	mg/l
$Na_2EDTA.2H_2O$:	0,1	mg/l
H_3BO_3:	0,185	mg/l
$MnCl_2.4H_2O$:	0,415	mg/l
$ZnCl_2$:	3 × 10^{-3}	mg/l
$CoCl_2.6H_2O$:	1,5 × 10^{-3}	mg/l
$CuCl_2.2H_2O$:	10^{-5}	mg/l
$Na_2MoO_4.2H_2O$:	7 × 10^{-3}	mg/l
$NaHCO_3$:	50	mg/l

Raggiunto l'equilibrio con l'aria, tale soluzione ha un pH di circa 8.

La raccomandazione precedente non esclude l'impiego di altre soluzioni a condizione, comunque, che siano rispettati i seguenti limiti per i componenti essenziali:

P:	≤ 0,7 mg/l
N:	≤ 10 mg/l
sostanze chelanti:	≤ 10^{-3} mmol/l
durezza (Ca + Mg):	≤ 0,6 mmol/l

Le soluzioni raccomandate e quelle riportate in bibliografia, punto 1), rispondono a questi requisiti.

1.6.1.3. Organismi per l'esperimento

Selezione delle specie

Si consiglia di usare una specie di alghe verdi a rapido accrescimento adatta alla coltura e ai saggi. Si ritengono idonee le seguenti specie:

- Selenastrum capricornutum ATCC 22662;
- Scenedesmus subspicatus 86.81 SAG;
- Chlorella vulgaris CCAP 211/11b.

Se si usano altre specie, se ne dovrebbe riportare il ceppo di appartenenza.

1.6.1.4. **Programmazione del saggio**

Concentrazione cellulare iniziale

Si raccomanda che la concentrazione cellulare iniziale nelle colture per il saggio sia di circa 10^4 cellule/ml per Selenastrum capricornutum e Scenedesmus subspicatus. Se si impiegano altre specie, la biomassa dovrebbe essere simile.

Concentrazioni della sostanza in esame

L'intervallo di concentrazioni in cui possono verificarsi effetti tossici, viene determinato in base ai risultati dei saggi orientativi. Per il saggio si dovrebbero scegliere almeno cinque concentrazioni distribuite con progressione geometrica. La concentrazione più bassa saggiata non dovrebbe provocare effetti sull'accrescimento delle alghe. La più alta concentrazione saggiata dovrebbe inibire l'accrescimento di almeno il 50% rispetto al controllo e, di preferenza, arrestarlo completamente.

Repliche e controlli

La programmazione del saggio dovrebbe prevedere preferibilmente tre prove per ciascuna concentrazione in esame e, idealmente, un numero doppio di controlli. Se la programmazione del saggio è giustificata la si può modificare aumentando il numero di concentrazioni e riducendo il numero di repliche per concentrazione.

Se si usa un solvente per sciogliere la sostanza in esame, la programmazione del saggio dovrebbe includere dei controlli supplementari contenenti il solvente alle più alte concentrazioni fra quelle impiegate nelle colture saggiate.

1.6.2. *Esecuzione del saggio*

Questo paragrafo contiene le istruzioni per l'esecuzione del saggio di sostanze facilmente solubili, scarsamente solubili nonché di sostanze volatili.

1.6.2.1. **Saggio per sostanze facilmente solubili in acqua**

Le colture per il saggio, contenenti le concentrazioni stabilite della sostanza da esaminare e le quantità fissate dell'inoculo di alghe, si preparano per diluizione di aliquote delle soluzioni madri della sostanza in esame e della sospensione di alghe; per le diluizioni si utilizza il filtrato della soluzione di coltura delle alghe (1.6.1.2).

Si agitano le beute di coltura e si collocano nell'apparecchiatura di coltura. Durante il saggio è necessario mantenere le alghe in sospensione e facilitare l'eliminazione di CO_2. A tal fine si può usare un sistema a scuotimento, agitazione o areazione. Le colture dovrebbero essere mantenute ad una temperatura compresa fra 21 e 25 °C, controllata nell'intervallo di ± 2 °C.

La concentrazione cellulare in ciascuna beuta va determinata almeno dopo 24, 48 e 72 ore dall'inizio del saggio. Per la determinazione del fondo quando si usano contatori di particelle, e per il bianco, quando si impiegano spettrofotometri, si utilizza il filtrato della soluzione di coltura delle alghe (1.6.1.2).

La misurazione del pH si effettua all'inizio del saggio e dopo 72 ore. Normalmente, durante il saggio, il pH delle soluzioni non dovrebbe variare più di una unità di pH.

1.6.2.2. **Saggio di sostanze con scarsa solubilità in acqua**

Quando la solubilità della sostanza da esaminare è dell'ordine di grandezza della più elevata concentrazione impiegata nel saggio, per preparare le soluzioni da esaminare sono necessarie soltanto piccole modifiche al procedimento precedente. Come soluzione madre della sostanza in esame si può usare una soluzione satura. Un altro accorgimento consiste nello sciogliere nella soluzione di coltura la sostanza in esame alla concentrazione voluta, prima dell'introduzione della sospensione di alghe.

Le soluzioni madri delle sostanze scarsamente solubili in acqua possono essere preparate per dispersione meccanica o con l'impiego di «veicoli» a scarsa tossicità per le alghe come: solventi organici, emulsionanti o disperdenti. Quando si impiega un «veicolo» la sua concentrazione non dovrebbe superare i 100 mg/l e, nelle programmazione del saggio, vanno previsti controlli supplementari per quelle soluzioni per le quali il veicolo è addizionato alla più alta concentrazione presente nelle soluzioni da esaminare.

1.6.2.3. **Saggio per sostanze volatili**

A tutt'oggi non esiste alcun metodo di saggio, che sia generalmente accettato, per saggiare sostanze volatili. Se è noto che una sostanza ha tendenza ad evaporare, si possono impiegare beute chiuse con accresciuto spazio di testa.

Sono state proposte delle varianti a questo metodo (vedi bibliografia, punto 1). Si dovrebbe cercare di determinare la quantità di sostanza che resta in soluzione e porre la massima cautela nell'interpretazione dei risultati dei saggi effettuati con sostanze volatili in sistemi chiusi.

2. DATI E VALUTAZIONE

Le concentrazioni cellulari misurate nelle colture per il saggio e nei controlli vengono raccolte in una tabella assieme alle concentrazioni della sostanza in esame ed ai tempi di misurazione. Per tracciare le curve di crescita si riporta in un grafico il valore medio della concentrazione cellulare per ogni concentrazione della sostanza esaminata e per i controlli in funzione del tempo.

Per determinare la relazione concentrazione/effetto della sostanza in esame si dovrebbero usare i due procedimenti che seguono.

2.1. **Confronto delle aree sotto le curve di crescita**

L'area al di sotto delle curve di crescita può essere calcolata con la formula seguente:

$$A = \frac{N_1 - N_0}{2} \times t_1 + \frac{N_1 + N_2 - 2N_0}{2} \times (t_2 - t_1) + \frac{N_{n-1} + N_n - 2N_0}{2} \times (t_n - t_{n-1})$$

dove:

A = area
N_0 = numero nominale di cellule/ml al tempo t_0
N_1 = numero misurato di cellule/ml al tempo t_1,
N_n = numero misurato di cellule/ml al tempo t_n,
t_1 = tempo della prima determinazione dopo l'inizio del saggio
t_n = tempo dell'ennesima determinazione dopo l'inizio del saggio

L'inibizione percentuale della crescita delle cellule per ogni concentrazione della sostanza in esame (I_A) è calcolata come differenza fra l'area sottostante la curva di crescita del controllo (A_c) e quella sottostante la curva di crescita corrispondente a ciascuna concentrazione della sostanza in esame (A_t):

$$I_A = \frac{A_c - A_t}{A_c} \times 100$$

Si riportano i valori di I_A su carta semilogaritmica o su carta semilogaritmica probit in funzione delle concentrazioni corrispondenti. Se i punti graficati, osservati ad occhio nudo, sono allineati secondo una retta, si traccia la retta oppure se si può assumere una distribuzione log-normale dei valori si traccia la retta di regressione lineare,

Un valore di EC_{50} si ricava dall'intersezione della retta (di regressione) con la parallela all'ascissa tracciata per I_A = 50 %. Per indicare senza ambiguità che tale valore è stato determinato con questo metodo di calcolo si propone l'uso del simbolo E_bC_{50}. In relazione a questo metodo che prescrive misurazioni 24, 48 e 72 ore, il simbolo diventa E_bC_{50} (0-72 h). Altri valori di EC, ad esempio E_bC_{10}, possono anche essere ottenuti dal grafico I_A «versus» logaritmo della concentrazione.

2.2. **Confronto delle velocità di accrescimento**

La velocità di crescita specifica media (μ) per colture ad accrescimento esponenziale può essere calcolata come

$$\mu = \frac{\ln N_n - \ln N_1}{t_n - t_1}$$

In alternativa si può ricavare la velocità di crescita specifica media dalla pendenza della retta di regressione di un diagramma che riporta ln N in funzione del tempo.

Per ciascuna concentrazione della sostanza in esame, si traccia il grafico della riduzione percentuale della velocità di crescita specifica media rispetto al valore del controllo, in funzione del logaritmo della concentrazione. Da questo grafico si può leggere la loro EC_{50}. Per indicare esplicitamente la EC_{50} ricavata con questo metodo, si propone l'uso del simbolo E_rC_{50}. Vanno indicati i tempi di misurazione, per esempio se il valore si riferisce a tempi di osservazione a 24 e 48 ore, il simbolo diventa E_rC_{50} (24 48 h).

Nota: La velocità di crescita specifica è una grandezza logaritmica e, a piccole variazioni di questa possono corrispondere elevate variazioni della biomassa. I valori di E_bC ed E_rC non sono perciò confrontabili numericamente.

3. **RELAZIONE**

Nella relazione sul saggio devono figurare, se possibile:

— Sostanza in esame: dati di identificazione chimica.

— Organismi per il saggio: origine, coltura di laboratorio, numero del ceppo, metodo di coltura.

— Condizioni del saggio:

  — data di inizio e fine del saggio e sua durata;

  — temperatura;

- composizione del mezzo;
- apparecchiatura per la coltivazione;
- pH delle soluzioni all'inizio ed alla fine della prova (se si è osservata una deviazione del pH superiore all'unità se ne dovrebbe fornire una spiegazione);
- veicolo e metodo usati per solubilizzare la sostanza in esame e concentrazione del veicolo nelle soluzioni per la prova;
- intensità e qualità della luce;
- concentrazioni saggiate (misurate o nominali).

- Risultati:
  - concentrazione cellulare per ciascuna beuta a ogni punto di misurazione e metodo di misura della concentrazione cellulare;
  - valori medi delle concentrazioni cellulari;
  - curve di crescita;
  - rappresentazione grafica della relazione concentrazione/effetto;
  - valori della EC e metodo di calcolo;
  - NOEC;
  - altri effetti osservati.

4. BIBLIOGRAFIA

(1) OCSE, Parigi 1981, *Linea guida 201*, decisione C(81) 30 def. del Consiglio.

(2) Umweltbundesamt, Berlino 1984, Verfahrensvorschlag «Hemmung der Zellvermehrung bei der Grünalge Scenedesmus subspicatus», in: Rudolph/Boje: *Ökotoxikologie*, ecomed, Landsberg, 1986.

Appendice

ESEMPIO DI PROCEDIMENTO PER LA COLTURA DELLE ALGHE

Osservazioni generali

Scopo della coltura effettuata con il seguente procedimento è ottenere colture di alghe per saggi di tossicità.

Si dovrebbero impiegare metodi idonei a garantire che le colture di alghe non siano contaminate da batteri (ISO 4833). È preferibile usare colture axeniche ma è essenziale che esse siano costituite da una sola specie di alghe.

Tutte le operazioni andrebbero effettuate in condizioni sterili per evitare contaminazioni da batteri o da altre alghe.

Attrezzatura e materiali

Vedere il paragrafo 1.6.1: Preparazioni ed organismi per il saggio.

Procedimenti per realizzare le colture di alghe

Preparazione delle soluzioni nutritive (mezzi)

Tutti i sali nutritivi del mezzo vengono preparati sottoforma di soluzioni concentrate madri e conservate al buio e al freddo. La loro sterilizzazione è effettuata per filtrazione o in autoclave.

Si prepara il mezzo addizionando l'esatta quantità di soluzione madre ad acqua distillata sterile, avendo cura di evitare le infezioni. Per ottenere mezzi solidi si aggiunge lo 0,8 % di agar.

Coltura madre

Le colture madri sono piccole colture di alghe regolarmente trasferite nel mezzo fresco per essere utilizzate come materiale di partenza per il saggio. Se le colture non sono impiegate con regolarità, esse vengono seminate in provette di agar a becco di clarino. Queste vengono trasferite nel mezzo fresco almeno una volta ogni due mesi.

Le colture madri vengono coltivate in beute coniche contenenti il mezzo appropriato (volume di circa 100 ml). Quando le alghe sono incubate a 20 °C con illuminazione continua, è necessario un trasferimento settimanale.

Durante il trasferimento una quantità della «vecchia» coltura viene trasferita con delle pipette sterili in una beuta contenente mezzo fresco, in modo che, per le specie a rapida crescita, la concentrazione iniziale sia circa 100 volte inferiore a quella della vecchia coltura.

La velocità di crescita di una specie può essere ricavato dalla curva di crescita. Se questa è nota è possibile stimare la densità alla quale si dovrebbe trasferire la coltura nel nuovo mezzo. Ciò deve essere fatto prima che la coltura raggiunga lo stadio di morte.

Coltura preliminare

La coltura preliminare serve a fornire una dose di alghe per l'inoculazione di colture per saggi. La coltura preliminare viene incubata nelle condizioni sperimentali ed usata mentre sta ancora crescendo esponenzialmente, di solito dopo un periodo di incubazione di circa tre giorni. Le colture di alghe che contengono cellule deformate o anormali vanno scartate.

TOSSICITÀ PER I LOMBRICHI

SAGGIO SU TERRENO ARTIFICIALE

1. METODO

1.1. Introduzione

In questo saggio di laboratorio la sostanza in esame viene aggiunta ad un terreno artificiale dove si pongono i lombrichi per quattordici giorni. Dopo tale periodo (facoltativamente dopo sette giorni) si esamina l'effetto letale della sostanza sui lombrichi. Il saggio fornisce un metodo di valutazione, a termine relativamente breve, dell'effetto sui lombrichi di sostanze chimiche assunte per via cutanea e alimentare.

1.2. Definizioni e unità

LC_{50}: concentrazione di una sostanza capace di uccidere il 50% degli animali in esame entro il periodo del saggio.

1.3. Sostanza di riferimento

Una sostanza di riferimento viene usata periodicamente per dimostrare che la sensibilità del sistema (di saggio) non è cambiata in modo significativo.

Come sostanza di riferimento si raccomanda cloroacetammide di grado analitico.

1.4. Principio del saggio

Il terreno è un elemento variabile; si usa pertanto, per questo saggio, un terreno fertile artificiale definito accuratamente. Lombrichi adulti della specie Eisenia foetida (vedi nota in appendice) vengono tenuti in un determinato terreno artificiale, trattato con diverse concentrazioni della sostanza in esame. Quattordici gior- (facoltativamente sette giorni) dopo l'inizio della prova, si sparge il contenuto dei recipienti su un vassoio e pe- ciascuna concentrazione si contano i lombrichi sopravvissuti.

1.5. Criteri di qualità

Il saggio è programmato in modo da essere il più possibile riproducibile per quanto concerne il substrato e gli organismi in esame. Alla fine del saggio, la mortalità fra gli animali di controllo non deve superare il 10%, altrimenti la prova non è valida.

1.6. Descrizione del metodo

1.6.1. *Materiali*

1.6.1.1. Substrato per il saggio

Come substrato di base per il saggio si usa un ben determinato terreno artificiale.

a) Substrato di base (percentuali espresse in peso secco)
   - 10% di torba di stagno (con pH più vicino possibile a 5,5-6,0, priva di residui visibili di piante e finemente macinata);
   - 20% di argilla caolinica preferibilmente con più del 50% di caolinite;
   - circa 69% di sabbia quarzosa industriale (sabbia a grana prevalentemente fine con oltre il 50% dei granuli di dimensioni comprese fra 0,05 e 0,2 mm). Qualora la sostanza in esame non possa essere sufficientemente dispersa in acqua, per ogni recipiente (di saggio) andrebbero messi da parte 10 g di tale sabbia da mescolare successivamente con la sostanza stessa;
   - circa 1% di carbonato di calcio ($CaCO_3$) in polvere, chimicamente puro, aggiunto per portare il pH a 6,0 ± 0,5.

b) Substrato per il saggio

   Il substrato per il saggio contiene il substrato di base, la sostanza in esame e acqua deionizzata.

   Il contenuto in acqua è circa dal 25 al 42% del peso secco del substrato di base.

   Il contenuto in acqua del substrato si determina per essiccamento di un campione fino a peso costante, a 105 °C. Il criterio base è che il terreno artificiale deve essere addizionato con acqua fino al punto in cui non vi sia acqua stagnante. Nel mescolare si dovrebbe fare attenzione ad ottenere una distribuzione uniforme della sostanza in esame e del substrato. Il procedimento seguito per addizionare la sostanza in esame al substrato deve essere riportato.

c) Substrato di controllo

   Il substrato di controllo contiene il substrato di base e l'acqua. Se si usa un additivo, un ulteriore controllo dovrebbe contenere la stessa quantità di additivo.

1.6.1.2. **Recipienti per il saggio**

Recipienti di vetro della capacità di circa un litro (adeguatamente coperti con coperchi di plastica, piatti o con una pellicola di plastica muniti di fori di ventilazione) vengono riempiti, sia per il saggio che per il controllo, con una quantità di substrato umido equivalente a 500 g di peso secco di substrato.

1.6.2. *Condizioni della prova*

I recipienti dovrebbero essere tenuti in camere climatizzate a 20 °C (± 2 °C) ed illuminate in continuazione. L'intensità luminosa dovrebbero essere compresa fra 400 e 800 lux.

La durata delle prove è di quattordici giorni, ma è facoltativo fare una prima determinazione della mortalità a sette giorni dall'inizio del saggio.

1.6.3. *Procedimento del saggio*

Concentrazioni del saggio

Le concentrazioni della sostanza in esame sono espresse in peso della sostanza per peso secco del substrato di base (mg/kg).

Saggio orientativo

L'intervallo delle concentrazioni che causano una mortalità variabile fra lo 0 ed il 100 % può essere determinato con un saggio orientativo che fornisca informazioni sull'intervallo di concentrazioni da impiegare nel saggio definitivo.

Si dovrebbe esaminare la sostanza alle seguenti concentrazioni: 1 000, 100, 10, 1, 0,1 mg di sostanza/kg di substrato in esame (peso secco).

Se si deve effettuare un saggio definitivo completo, per ogni prova orientativa e per il controllo non trattato, potrebbe essere sufficiente un gruppo di dieci lombrichi per ciascuna concentrazione.

Saggio definitivo

I risultati del saggio orientativo vengono impiegati per scegliere almeno 5 concentrazioni in serie geometrica, che causino una mortalità variabile fra lo 0 ed il 100 % e che differiscano fra loro per un fattore costante non superiore a 1,8.

Con questa serie di concentrazioni, il saggio dovrebbe consentire una stima la più precisa possibile del valore della LC_{50} e dei suoi limiti di confidenza.

Nella prova definitiva si usano almeno quattro gruppi di saggio per concentrazione e quattro per controlli non trattati, ciascuno con dieci lombrichi. I risultati ottenuti con questi gruppi saggiati in replicato vengono espressi con il valore medio e con la deviazione standard relativa.

Quando due concentrazioni consecutive, nel rapporto 1,8, danno una mortalità pari allo 0 ed al 100 %, questi due valori sono sufficienti ad indicare l'intervallo entro il quale è compresa la LC_{50}.

Miscela del substrato di base per il saggio e della sostanza in esame

Se possibile, il substrato per il saggio dovrebbe essere preparato senza alcun additivo che non sia acqua. Subito prima dell'inizio del saggio, si mescola con il substrato di base, oppure vi si sparge sopra uniformemente, con uno spruzzatore da cromatografia o dispositivo similare, un'emulsione o dispersione in acqua deionizzata o in altro solvente della sostanza da esaminare.

Se insolubile in acqua, la sostanza in esame può essere disciolta nel minor volume possibile di un idoneo solvente organico (per esempio esano, acetone, cloroformio).

Per solubilizzare, disperdere o emulsionare la sostanza in esame, si possono impiegare soltanto agenti che volatilizzano rapidamente. Prima dell'uso occorre ventilare il substrato per il saggio. Si deve aggiungere una quantità di acqua pari a quella evaporata. Il controllo dovrebbe contenere la stessa quantità di tutti gli additivi.

Se la sostanza in esame non è solubile, disperdibile o emulsionabile in solventi organici, 10 g di una miscela costituita da sabbia fine quarzosa e dalla quantità di sostanza in esame necessaria per trattare 500 g di peso secco di terreno artificiale, vengono mescolate con 490 g di peso secco del substrato per il saggio.

Per ciascun gruppo di saggio, si riempie ogni recipiente di vetro con una quantità di substrato umido equivalente a 500 g di peso secco, e sulla superficie del substrato si collocano 10 lombrichi precedentemente condizionati per 24 ore in un simile substrato umido e quindi lavati rapidamente ed asciugati dell'acqua in eccesso per assorbimento su carta da filtro.

I recipienti vengono coperti con coperchi, piatti o pellicole di plastica perforati per impedire l'essiccamento del substrato e sono mantenuti nelle condizioni sperimentali per quattordici giorni.

Le valutazioni andrebbero effettuate quattordici giorni (facoltativamente sette giorni) dopo l'inizio del saggio. Si sparge il substrato su un piatto di vetro o di acciaio inossidabile. Si esaminano i lombrichi e si determina il numero di quelli sopravvissuti. I lombrichi sono considerati morti se non reagiscono ad un leggero stimolo meccanico sull'estremità anteriore.

Se l'esame è effettuato dopo sette giorni, il recipiente è riempito di nuovo con lo stesso substrato ed i lombrichi sopravvissuti vengono collocati sulla sua superficie.

1.6.4. *Organismi per il saggio*

Gli organismi per il saggio dovrebbero essere individui adulti di Eisenia foetida (vedi la nota dell'allegato) (di almeno due mesi con clitella) del peso umido di 300-600 mg. (Per il metodo di allevamento vedi allegato).

2. DATI

2.1. Trattamento e valutazione dei risultati

Si riportano le concentrazioni della sostanza esaminata con le rispettive percentuali di lombrichi morti.

Quando i dati sono affidabili si dovrebbero determinare il valore della LC_{50} e i limiti di confidenza ($P = 0,05$) utilizzando metodi standard (Litchfield e Wilcoxon, 1949 o un metodo equivalente). Il valore della LC_{50} dovrebbe essere espresso in mg di sostanza in esame per kg di substrato per il saggio (peso secco).

Nei casi in cui la pendenza della curva di concentrazione sia troppo elevata per consentire il calcolo della LC_{50}, è sufficiente una stima grafica di tale valore.

Quando due concentrazioni consecutive, nel rapporto di 1,8, danno mortalità pari allo 0% ed al 100%, questi due valori sono sufficienti per indicare l'intervallo entro il quale è situata la LC_{50}.

3. RELAZIONE

3.1. Relazione sul saggio

Nella relazione sul saggio devono figurare, se possibile:

- la dichiarazione che la prova è stata eseguita conformemente ai criteri di qualità sopra riportati,
- il saggio effettuato (saggio orientativo e/o saggio definitivo),
- l'esatta descrizione delle condizioni in cui è stato effettuato il saggio o la dichiarazione che il saggio è stato condotto conformemente al metodo, qualsiasi modifica del procedimento deve essere riportata,
- l'esatta descrizione del procedimento seguito per mescolare la sostanza in esame con il substrato di base,
- informazioni sugli organismi impiegati per il saggio (specie, età, media ed intervallo di variazione del peso, condizioni di mantenimento e di allevamento fornitore),
- il metodo seguito per la determinazione della LC_{50},
- i risultati del saggio comprensivi di tutti i dati utilizzati,
- la descrizione dei sintomi e dei cambiamenti osservati nel comportamento degli organismi per il saggio,
- la mortalità nei controlli,
- la LC_{50} oppure la più elevata concentrazione saggiata che non provoca mortalità e la più bassa concentrazione saggiata che provoca il 100% di mortalità, a quattordici giorni (facoltativamente a sette giorni) dopo l'inizio della prova,
- il grafico della curva concentrazione/risposta,
- i risultati ottenuti con la sostanza di riferimento, specificando se siano stati ottenuti in associazione con il saggio in questione o da precedenti saggi di controllo di qualità.

4. BIBLIOGRAFIA

(1) OCSE, Parigi 1981, *Linea Guida 207*, decisione C(81) 30 def. del Consiglio.

(2) Edwards, C. A. e Lofty, 1977, *Biology of Earthworms*, Londra: Chapman and Hall, 331 pagine.

(3) Bouche, M. B., 1972, *Lombriciens de France, Écologie et Systématique*, Institut National de la Recherche Agronomique, 671 pagine.

(4) Litchfield, J. T. e Wilcoxon, F., A simplified method of evaluating dose-effect experiments. *J. Pharm. Exp. Therap.*, vol. 96, pagine 99.

(5) Commissione delle Comunità europee 1983, *Development of a standardized laboratory method for assessing the toxicity of chemical substances to earthworms*. Report EUR 8714 EN.

(6) Umweltbundesamt/Biologische Bundesanstalt für Land- und Forstwirtschaft, Berlino 1984, Verfahrensvorschlag «Toxizitätstest am Regenwurm Eisenia foetida in künstlichem Boden», in: Rudolph/Boje: *Ökotoxikologie*, ecomed, Landsberg, 1986.

Appendice

Allevamento e mantenimento dei lombrichi prima del saggio

Per l'allevamento si pongono gli animali, da 30 a 50 lombrichi adulti, in una scatola di allevamento con substrato fresco e si rimuovono dopo 14 giorni. Questi animali possono essere utilizzati per ulteriori gruppi di allevamento. I lombrichi nati dalle zooteche vengono impiegati per i saggi quando sono maturi (nelle condizioni prescritte, dopo 2-3 mesi).

Condizioni di allevamento e mantenimento

Camera climatizzata: temperatura di 20 °C (± 2 °C), di preferenza illuminata ininterrottamente (intensità da 400 a 800 lux).

Scatole di allevamento: idonei contenitori poco profondi del volume da 10 a 20 litri.

Substrato: Eisenia foetida può essere allevata in diversi escrementi animali. Come terreno per l'allevamento si raccomanda l'uso di una miscela costituita dal 50 % in volume di torba e dal 50 % di sterco di mucca o di cavallo. Il terreno dovrebbe avere un pH di circa 6-7 (corretto con carbonato di calcio) ed una bassa conduttività ionica (meno di 6 mmhos o 0,5 % di concentrazione salina).

Il substrato dovrebbe essere umido ma non troppo bagnato.

Oltre al metodo sopra esposto si possono impiegare con buoni risultati anche altri procedimenti.

Nota: Esistono due varietà di Eisenia foetida che alcuni tassonomi hanno separato in specie (Bouché, 1972). Queste sono morfologicamente simili ma una, la Eisenia foetida foetida, ha delle tipiche strisce o fasce trasversali sui segmenti mentre l'altra, la Eisenia foetida andrei, ne è priva ed ha un colore rossiccio screziato. Ove possibile si dovrebbe usare la Eisenia foetida andrei. Se è disponibile la metodologia necessaria, si possono usare altre specie.

BIODEGRADAZIONE

ZAHN-WELLENS TEST

1. METODO

1.1. Introduzione

Il metodo è destinato a valutare la potenziale biodegradabilità ultima [1] delle sostanze organiche idrosolubili e non volatili esposte a concentrazioni relativamente elevate di microorganismi nel corso di un saggio statico.

Può verificarsi un assorbimento chimico-fisico della sostanza in esame sui solidi sospesi; di ciò si dovrà tener conto nell'interpretare i risultati (vedi punto 3.2).

Le sostanze da studiare vengono impiegate a concentrazioni corrispondenti a valori del DOC compresi fra 50 e 400 mg/l o a valori del COD compresi fra 100 e 1 000 mg/l (DOC = carbonio organico disciolto; COD = domanda chimica di ossigeno). Dette concentrazioni, relativamente elevate, hanno il vantaggio dell'attendibilità analitica. I composti dotati di proprietà tossiche possono ritardare o inibire il processo di degradazione.

In questo metodo, la misura della concentrazione del carbonio organico disciolto o la richiesta chimica di ossigeno vengono impiegate per valutare la biodegradazione ultima della sostanza in esame.

L'impiego simultaneo di un metodo di analisi specifico può permettere di valutare la biodegradazione primaria della sostanza (modifica della struttura chimica della sostanza in esame).

Il metodo può essere applicato soltanto all'esame di quelle sostanze organiche le quali, alle concentrazioni impiegate per la prova:

— sono solubili in acqua nelle condizioni sperimentali;

— hanno una tensione di vapore trascurabile nelle condizioni sperimentali;

— non esercitano effetti inibitori sui batteri;

— sono assorbite soltanto in misura limitata nel sistema sperimentale;

— non vanno perdute per effetto della formazione di schiume nella soluzione in esame.

La disponibilità di dati sulle proporzioni relative dei principali componenti del materiale da esaminare sarà utile per interpretare i risultati, particolarmente nei casi in cui i risultati sono bassi o trascurabili.

Per poter interpretare i risultati più bassi e per poter scegliere le opportune concentrazioni sperimentali sarà altresì utile disporre di dati sulla tossicità della sostanza nei confronti dei microorganismi.

1.2. Definizioni ed unità

Il livello di degradazione raggiunto alla fine dell'esperimento, denominato «biodegradabilità nel Zahn-Wellens Test», è dato dall'espressione:

$$D_T (\%) = \left[1 - \frac{(C_T - C_B)}{(C_A - C_{BA})} \right] \times 100$$

D_T = biodegradazione (%) al tempo T

C_A = valori del DOC (o del COD) della miscela in esame, espressi in mg/l e misurati tre ore dopo l'inizio della prova (DOC = carbonio organico disciolto, COD = domanda chimica di ossigeno)

C_T = valori del DOC o del COD nella miscela in esame al momento del prelievo (mg/l)

C_B = valori del DOC o del COD relativi al «bianco» al momento del prelievo (mg/l)

C_{BA} = valori del DOC o del COD del «bianco», misurati tre ore dopo l'inizio della prova (mg/l)

L'entità della degradazione dev'essere arrotondata all'unità percentuale.

La degradazione percentuale si esprime come eliminazione percentuale del DOC (o del COD) della sostanza sperimentata.

La differenza tra il valore misurato dopo tre ore e il valore calcolato, o preferibilmente misurato inizialmente, può fornire informazioni utili in merito all'eliminazione della sostanza (vedi punto 3.2: «Interpretazione dei risultati»).

[1] I termini «ultima» e «primaria», riferiti alla biodegradazione, sono traduzioni dei termini inglesi «ultimate» e «primary», rispettivamente.

1.3. **Sostanze di riferimento**

In taluni casi, quando vengono studiate sostanze nuove, può essere utile l'impiego di sostanze di riferimento. Tuttavia, non possono ancora essere raccomandate specifiche sostanze di riferimento.

1.4. **Principio del metodo**

In un recipiente di vetro da 1 a 4 litri, provvisto di agitatore e aeratore, vengono introdotti contemporaneamente il *fango attivo*, *le sostanze nutritive minerali* e *il materiale da esaminare, quale unica fonte di carbonio*, in soluzione acquosa. La miscela viene agitata ed aerata alla temperatura di 20-25 °C, sotto illuminazione diffusa o in camera oscura, per la durata massima di 28 giorni. Il processo di degradazione viene seguito mediante determinazione dei valori del COD o del DOC nella soluzione filtrata, eseguita giornalmente o comunque ad intervalli appropriati e regolari. Il rapporto fra il DOC (*o il COD*) *eliminato dopo ciascun intervallo* ed il valore a tre ore dall'inizio viene espresso come biodegradazione percentuale e serve per misurare l'entità della degradazione in quel momento. Diagrammando tale valore in funzione del tempo si costruisce la curva di biodegradazione. Impiegando un metodo analitico specifico è possibile misurare le variazioni di concentrazione della sostanza in esame dovute alla biodegradazione (biodegradabilità primaria).

1.5. **Criteri di qualità**

Prove d'intercalibrazione tra laboratori hanno dimostrato che la riproducibilità di questo metodo è soddisfacente.

La sensibilità del metodo è determinata principalmente dalla variabilità del «bianco» e, in misura minore, dalla precisione con cui è possibile determinare il carbonio organico disciolto e la quantità del composto da esaminare contenuto nel mezzo.

1.6. **Descrizione del metodo**

1.6.1. *Preparazioni*

1.6.1.1. **Reattivi**

- Acqua per il saggio: acqua potabile a contenuto di carbonio organico inferiore a 5 mg/l. La concentrazione globale degli ioni calcio e magnesio non deve superare 2,7 mmol/l; in caso contrario sarà necessaria un'opportuna diluizione con acqua deionizzata o distillata
- Acido solforico, p.a., 50 g/l
- Soluzione di idrossido di sodio, p.a., 40 g/l
- Soluzione nutritiva minerale: sciogliere in 1 litro d'acqua deionizzata:
  cloruro ammonico, NH_4Cl, p.a. 38,5 g
  ortofosfato monosodico diidrato $NaH_2PO_4 \cdot 2H_2O$, p.a. 33,4 g
  ortofosfato monopotassico, KH_2PO_4, p.a. 8,5 g
  ortofosfato dipotassico, K_2HPO_4, p.a. 21,75 g

La miscela serve contemporaneamente da sostanza nutritiva e da tampone.

1.6.1.2. **Apparecchiatura**

Recipiente cilindrico di vetro, del volume da 1 a 4 litri

Dispositivo di agitazione. L'agitatore vero e proprio, di vetro o metallo, dev'essere sostenuto da un albero adatto e deve girare a 5-10 cm circa dal fondo del recipiente. Si può anche impiegare un agitatore magnetico, con barretta da 7 a 10 cm di lunghezza

Tubo di vetro, del diametro interno di 2-4 mm, per l'introduzione dell'aria. L'apertura del tubo deve trovarsi a 1 cm circa sopra il fondo del recipiente

Centrifuga (3 550 giri circa)

pH-metro

Misuratore dell'ossigeno disciolto

Filtri di carta

Apparecchiature per filtrazione su membrana

Filtri a membrana, porosità 0,45 μm. I filtri a membrana sono adatti solo a condizione che non cedano carbonio organico e non assorbano la sostanza durante la filtrazione

Apparecchiatura analitica per la determinazione del contenuto in carbonio organico e della domanda chimica di ossigeno

1.6.1.3. **Preparazione dell'inoculo**

Lavare il fango attivo proveniente da un impianto di trattamento biologico centrifugando o lasciando sedimentare ripetutamente con l'acqua per il saggio (vedi sopra).

Il fango attivo deve trovarsi in idonee condizioni. Esso può essere prelevato da un impianto di trattamento di acque di scarico in buone condizioni di funzionamento. Per ottenere il maggior numero possibile di specie o ceppi differenti di batteri è preferibile mescolare gli inoculi provenienti da varie fonti (per esempio: vari impianti di trattamento, estratti di suoli, acque di fiume, ecc.). La miscela deve essere trattata come descritto sopra.

Per controllare l'attività del fango attivo vedi oltre il paragrafo «Controllo funzionale».

1.6.1.4. **Preparazione delle soluzioni da esaminare**

Nel recipiente per il saggio, introdurre 500 ml dell'acqua per il saggio, insieme alla soluzione nutritiva minerale in quantità pari a *2,5 ml/l e al fango attivo in quantità corrispondente a 0,2-1,0 g/l* di materiale secco nella miscela finale. Aggiungere la soluzione madre della sostanza da esaminare in quantità tale da ottenere un DOC da 50 a 400 mg/l nella miscela finale. I corrispondenti valori del COD saranno da 100 a 1 000 mg/l. Portare con l'acqua di cui sopra al volume totale da 1 a 4 litri. Il volume totale da scegliere dipende dal numero dei campioni da prelevare per le determinazioni del DOC o del COD, nonché dai volumi necessari per il procedimento analitico.

Normalmente, un volume di 2 litri può essere considerato soddisfacente.

Per ciascuna serie di saggi va preparato almeno un recipiente di controllo (bianco): esso deve contenere soltanto il fango attivo e la soluzione nutritiva minerale portata allo stesso volume totale dei recipienti per il saggio.

1.6.2. *Esecuzione del saggio*

Si agita il contenuto dei recipienti per il saggio con agitatori magnetici od a spirale, sotto illuminazione diffusa o in camera oscura e alla temperatura di 20-25 °C. L'aerazione dev'essere ottenuta insufflando aria compressa purificata facendola passare attraverso un tampone di cotone e, se necessario, una bottiglia di lavaggio. Si farà in modo che il fango non si depositi e che la concentrazione dell'ossigeno non scenda al di sotto di 2 mg/l.

Il valore del pH deve essere controllato ad intervalli regolari (ad esempio quotidianamente) e regolato se necessario sul valore di 7-8.

Le perdite dovute all'evaporazione andranno compensate immediatamente prima di ogni prelievo aggiungendo acqua deionizzata o distillata nelle quantità richieste. Sarà particolarmente utile segnare il livello del liquido sul recipiente prima di avviare la prova. Dopo ogni campionamento (in assenza di aerazione e agitazione) si apporranno nuovi contrassegni. I primi campioni dovranno sempre essere prelevati tre ore dopo l'inizio della prova per verificare se ha luogo un assorbimento del materiale in esame da parte del fango attivo.

L'eliminazione della sostanza in esame dev'essere seguita mediante determinazioni del DOC e del COD, effettuate quotidianamente o ad intervalli comunque regolari. I campioni prelevati dal recipiente di saggio e dal «bianco» devono essere filtrati su carta accuratamente lavata. I primi 5 ml del filtrato della soluzione devono essere scartati. I fanghi difficilmente filtrabili possono essere eliminati in precedenza centrifugando per 10 minuti. Le determinazioni del COD e del DOC devono essere effettuate almeno in doppio. L'esperimento deve proseguire per la durata di 28 giorni.

Nota: I campioni che rimangono torbidi devono essere filtrati attraverso filtri a membrana. Questi ultimi non devono cedere od assorbire materiale organico.

Controllo funzionale del fango attivo

In parallelo a ciascuna serie di esperimenti, deve essere saggiata una sostanza nota, destinata a controllare la capacità funzionale del fango attivo. A questo scopo si è mostrato utile il glicoldietilenico.

Adattamento

Qualora si eseguano analisi ad intervalli relativamente brevi (ad esempio quotidianamente), l'adattamento può essere chiaramente controllato dalla curva di degradazione (vedi figura 2). Il saggio, pertanto, non deve essere avviato immediatamente prima dell'interruzione di fine settimana.

Qualora l'adattamento si verifichi verso la fine del periodo di saggio, il saggio stesso può essere prolungato fino al momento in cui la degradazione è terminata.

Nota: Se è necessaria una conoscenza più vasta del comportamento dei fanghi adattati, lo stesso fango attivo deve essere posto nuovamente a contatto con lo stesso materiale di prova, procedendo come segue:

arrestare l'agitatore e l'aeratore e lasciar sedimentare il fango attivo; eliminare il surnatante, riempire fino a 2 litri con acqua per il saggio, agitare per 15 minuti e lasciare nuovamente sedimentare; eliminare nuovamente il surnatante e impiegare il fango rimanente per ripetere il saggio con gli stessi materiali conformemente a quanto indicato ai precedenti punti 1.6.1.4 e 1.6.2. Il fango attivo può essere isolato anche per centrifugazione anziché per sedimentazione.

Il fango adattato può essere mescolato con fango fresco, fino ad una quantità totale di 0,2-1 g di sostanza secca per litro.

Mezzi analitici

Normalmente i campioni vengono filtrati attraverso un filtro di carta accuratamente lavato (per il lavaggio, impiegare acqua deionizzata).

I campioni che restano torbidi devono essere filtrati con filtri a membrana (0,45 µm).

La concentrazione del DOC dev'essere determinata in doppio sul campione filtrato (scartando i primi 5 ml) con apparecchiatura per la determinazione del TOC. Se il filtrato non può essere analizzato lo stesso giorno, esso va conservato in frigorifero fino al giorno successivo. Una conservazione più lunga non è da raccomandarsi.

La concentrazione del COD va determinata sul campione filtrato con il procedimento analitico descritto nel riferimento (bibliografico 2).

2. DATI E VALUTAZIONE

Le concentrazioni del DOC e dei COD devono essere determinate almeno in doppio in ogni campione secondo quanto indicato al punto 1.6.2. La degradazione al momento T viene calcolata mediante la formula riportata (insieme alle definizioni) al punto 1.2.

La misura della degradazione dev'essere arrotondata all'unità percentuale. L'entità della degradazione raggiunta, alla fine dell'esperimento viene definita come «biodegradabilità secondo Zahn-Wellens».

Nota: Qualora la degradazione completa venga raggiunta prima che il tempo necessario per il saggio sia terminato e questo risultato sia confermato da una seconda analisi effettuata il giorno successivo, il saggio può essere considerato concluso.

3. RELAZIONE

3.1. Relazione sul saggio

Nella relazione sul saggio devono figurare, se possibile:

- la concentrazione iniziale della sostanza,
- tutte le altre informazioni e risultati sperimentali concernenti la sostanza esaminata, la sostanza di riferimento (se impiegata) e il «bianco»,
- la concentrazione dopo tre ore,
- la curva di biodegradazione con la relativa descrizione,
- la data e la località di prelievo dei microorganismi usati per l'esperimento, lo stato di adattamento, la concentrazione impiegata, ecc.
- le giustificazioni scientifiche per qualsiasi modifica apportata al procedimento sperimentale.

3.2. Interpretazione dei risultati

La rimozione del DOC (o del COD) che si verifica gradualmente entro giorni o settimane indica che la sostanza in esame sta subendo biodegradazione.

In taluni casi può comunque entrare in gioco l'assorbimento chimico-fisico, denotato dal fatto che la scomparsa si verifica in modo completo o parziale fin dall'inizio, entro le prime tre ore e che la differenza di risposta tra i surnatanti del controllo e del saggio rimane a livelli inaspettatamente bassi.

Se si vuole distinguere fra la biodegradazione (o biodegradazione parziale) e l'assorbimento, sono necessari ulteriori saggi.

Ciò può essere fatto in numerosi modi, ma il metodo più convincente consiste nell'impiegare il surnatante quale inoculo in una prova del dossier di base (preferibilmente un saggio respirometrico).

Le sostanze che, nel corso di questo saggio, mostrano un'elevata eliminazione del DOC (o del COD) non dovuta ad assorbimento devono essere considerate potenzialmente biodegradabili. Una rimozione parziale, non dovuta ad assorbimento indica che il prodotto chimico è soggetto almeno in parte alla biodegradazione.

Una rimozione bassa o nulla del DOC (o del COD) può essere dovuta all'inibizione dei microorganismi da parte delle sostanze in esame: ciò può anche essere rivelato dalla lisi e dalla perdita di fango, accompagnata dalla formazione di surnatanti torbidi. In questo caso il saggio deve essere ripetuto impiegando la sostanza in esame a concentrazione minore.

L'impiego di un metodo di analisi specifico per la sostanza in esame o della sostanza marcata con ^{14}C può consentire una maggiore sensibilità. Nel caso di composto marcato al ^{14}C, il recupero di $^{14}CO_2$ confermerà che la biodegradazione è avvenuta.

Quando i risultati sono espressi in termini di biodegradazione primaria, dovrà essere fornita, possibilmente, una spiegazione della modifica di struttura chimica che conduce alla diminuzione di risposta della sostanza in esame.

Si deve dimostrare la validità del metodo analitico e fornire la risposta ottenuta sul «bianco».

BIBLIOGRAFIA

(1) OCSE, Parigi 1981, *Linea Guida 302 B*, decisione C(81) 30 def. del Consiglio.

(2) Allegato V C.9 Degradazione: Domanda chimica di ossigeno; direttiva 84/449/CEE della Commissione, *Gazzetta ufficiale delle Comunità europee* n. L 251 del 19 settembre 1984.

Appendice

ESEMPIO DI VALUTAZIONE

Composto organico:	acido 4-etossibenzoico
Concentrazione teorica della sostanza:	600 mg/l
DOC teorico:	390 mg/l
Inoculo:	impianto di trattamento delle acque fognarie di . . .
Concentrazione	1 g di sostanza secca
Stato di adattamento	non adattato
Analisi:	determinazione DOC
Quantità del campione	3 ml
Sostanza di controllo	glicoldietilenico
Tossicità del composto	nessun effetto tossico al di sotto di 1 000 mg/l (metodo utilizzato: saggio in tubi di fermentazione)

Tempi di analisi	Sostanza di riferimento				Sostanza in esame		
	Bianco DOC (¹) mg/l	DOC (¹) mg/l	DOC netto mg/l	Degradazione %	DOC (¹) mg/l	DOC netto mg/l	Degradazione %
0	—	—	300,0	—	—	390,0	—
3 ore	4,0	298,0	294,0	2	371,6	367,6	6
1 giorno	6,1	288,3	282,2	6	373,3	367,2	6
2 giorni	5,0	281,2	276,2	8	360,0	355,0	9
5 giorni	6,3	270,5	264,2	12	193,8	187,5	52
6 giorni	7,4	253,3	245,9	18	143,9	136,5	65
7 giorni	11,3	212,5	201,2	33	104,5	93,2	76
8 giorni	7,8	142,5	134,7	55	58,9	51,1	87
9 giorni	7,0	35,0	28,0	91	18,1	11,1	97
10 giorni	18,0	37,0	19,0	94	20,0	2,0	99

(¹) Valore medio di tre determinazioni.

Figura 1

Esempio di curve di biodegradazione

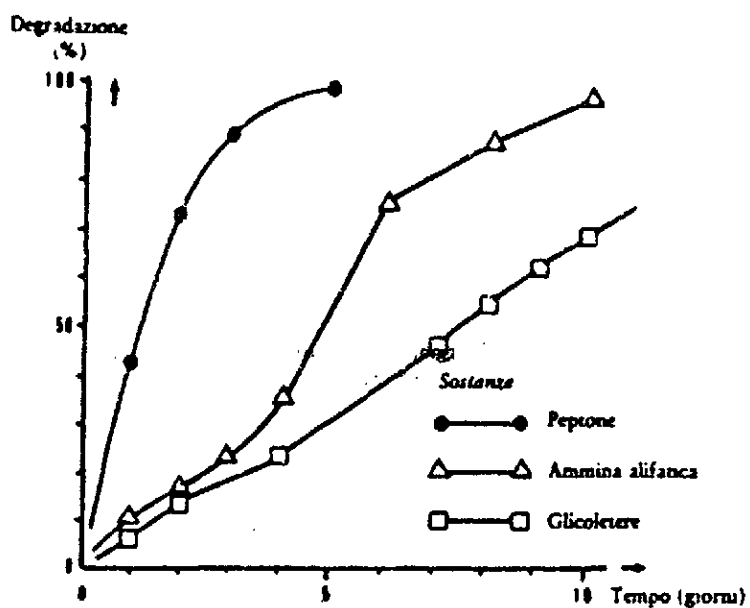
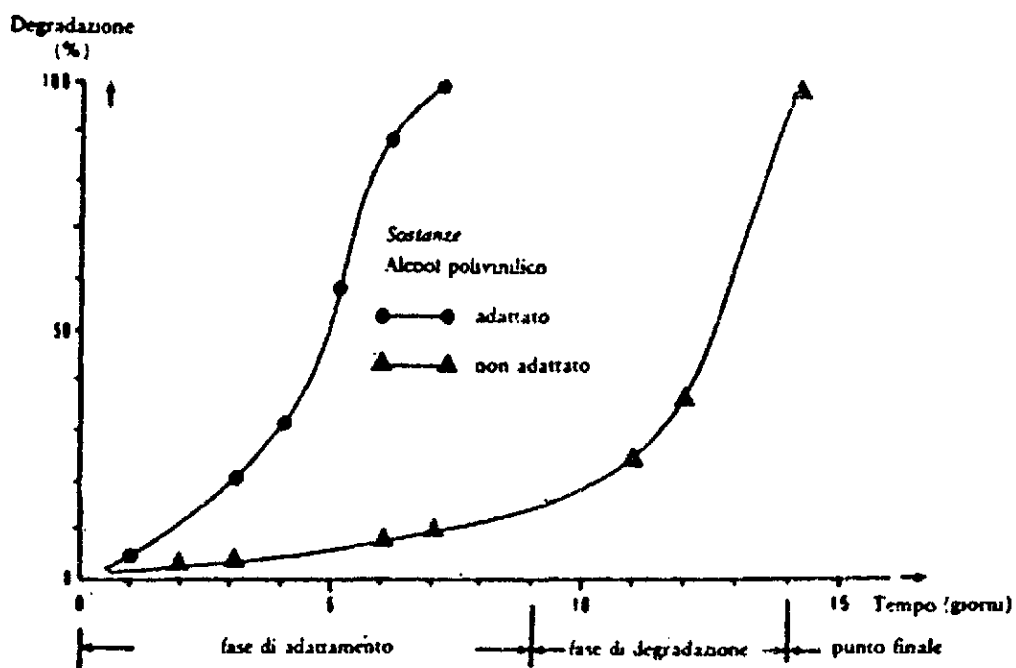



Figura 2

Esempio di adattamento dei fanghi

BIODEGRADAZIONE

SAGGIO DI SIMULAZIONE CON FANGHI ATTIVI

1. METODO

1.1. Introduzione

1.1.1. *Osservazioni generali*

Il metodo può essere applicato esclusivamente a quelle sostanze organiche che, alle concentrazioni impiegate per il saggio:

— sono solubili in acqua nella misura necessaria per la preparazione delle soluzioni per il saggio,

— hanno, nelle condizioni del saggio, una tensione di vapore trascurabile,

— non esercitano effetti inibitori sui batteri.

La disponibilità di dati sulle proporzioni relative dei principali componenti del prodotto da esaminare sarà utile per interpretare i risultati ottenuti, in particolare in quei casi in cui i valori trovati sono bassi o non significativi.

È auspicabile poter disporre di dati sulla tossicità della sostanza nei confronti dei microorganismi per l'interpretazione di eventuali bassi valori e per la scelta delle concentrazioni sperimentali appropriate.

1.1.2. *Determinazione della biodegradabilità ultima (analisi DOC/COD)* (1)

Scopo del metodo è la determinazione della biodegradabilità ultima mediante misura della rimozione della sostanza e di qualsiasi metabolita in un impianto modello a fanghi attivi, ad una concentrazione > 12 mg DOC/l (o a circa 40 mg COD/l). Sembrano ottimali 20 mg DOC/l (DOC = carbonio organico disciolto/litro; COD = domanda chimica di ossigeno).

Si deve determinare il contenuto di carbonio organico (o la domanda chimica di ossigeno) del materiale in esame.

1.1.3. *Determinazione della biodegradabilità primaria (analisi specifica)* (1)

Scopo del metodo è la determinazione della biodegradabilità primaria di una sostanza in un impianto pilota a fanghi attivi, a una concentrazione di circa 20 mg/l, con l'impiego di un metodo analitico specifico (se il metodo analitico e la tossicità della sostanza lo consentono, si può usare una concentrazione più bassa o più elevata). Questo consente la valutazione della biodegradabilità primaria della sostanza (modifica della struttura chimica della sostanza in esame).

Il metodo non è destinato alla determinazione della mineralizzazione della sostanza esaminata.

Per la determinazione della sostanza esaminata occorre disporre di un metodo analitico adeguato.

1.2. Definizioni e unità

1.2.1. *Analisi DOC/COD*

Il grado di rimozione della sostanza è dato da:

$$DR = \frac{T - (E - E_O)}{T} \times 100\,\% \qquad [1\ a)]$$

dove:

DR = grado di rimozione percentuale del DOC (o del COD) relativo alla sostanza in esame entro il tempo medio di ritenzione fissato

T = concentrazione della sostanza in esame nell'affluente in mg DOC/litro (o mg COD/litro)

E = concentrazione del DOC (o del COD) nell'effluente dell'unità per il saggio in mg DOC/litro (o mg COD/litro)

E_O = concentrazione del DOC (o del COD) nell'effleuente dell'unità per il «bianco» in mg DOC/litro (o mg COD/litro)

La degradazione si definisce come la rimozione percentuale di DOC (o di COD), nel tempo di ritenzione fissato, relativo alla sostanza in esame.

---

(1) I termini «ultima» e «primaria», riferiti alla biodegradazione, sono traduzioni dei termini inglesi «ultimate» e «primary», rispettivamente.

1.2.2. *Analisi specifica*

L'eliminazione percentuale della sostanza esaminata dalla fase acquosa (R_w), nel tempo medio di ritenzione fissato, si ricava da:

$$R_w = \frac{C_i - C_O}{C_i} \times 100\% \qquad [1\ b)]$$

dove:

C_i = concentrazione della sostanza nell'affluente dell'unità per il saggio (mg di sostanza/litro, determinata con l'analisi specifica)

C_O = concentrazione della sostenza nell'effluente dell'unità per il saggio (mg di sostanza/litro, determinata con l'analisi specifica)

1.3. Sostanze di riferimento

In alcuni casi, quando si esamina una nuova sostanza, possono essere utili delle sostanze di riferimento; ciò nonostante, non è attualmente possibile indicare sostanze di riferimento specifiche.

1.4. Principio del metodo

Per la determinazione della biodegradabilità ultima si fanno funzionare in parallelo due unità pilota a fanghi attivi (saggio di conferma dell'OCSE o unità a vaso poroso). La sostanza in esame viene addizionata all'affluente (liquame sintetico o domestico) di una delle unità, mentre l'altra riceve soltanto liquame. Per la determinazione della biodegradazione primaria con l'analisi specifica dell'affluente e dell'effluente si impiega soltanto una unità.

Si misurano le concentrazioni di DOC (o di COD) negli effluenti, oppure si determinano con l'analisi specifica le concentrazioni della sostanza.

Il DOC dovuto alla sostanza in esame non viene misurato ma soltanto specificato. Quando si effettuano le misurazioni del DOC (e del COD), si assume che la differenza fra le concentrazioni medie degli effluenti del saggio e del controllo sia dovuta alla sostanza in esame non degradata.

Quando vengono effettuate analisi specifiche è possibile misurare la variazione della concentrazione della sostanza in esame (biodegradazione primaria).

Si possono fare funzionare le unità seguendo il «sistema delle unità accoppiate», con il procedimento della transinoculazione.

1.5. Criteri di qualità

La concentrazione di partenza della sostanza dipende dal tipo di analisi effettuata e dalle sue limitazioni.

1.6. Descrizione del metodo

1.6.1. *Preparazione*

1.6.1.1. Apparecchiatura

A parte il caso delle analisi specifiche, è necessaria una coppia di unità dello stesso tipo. Possono essere impiegati due sistemi:

Saggio di conferma OCSE

L'apparecchiatura (allegato I) è costituita da un serbatoio (A) per il liquame sintetico, da una pompa di dosaggio (B), da una vasca di aerazione (C), da un sedimentatore (D), una pompa ad aria compressa (E) per riciclare i fanghi attivi e una vasca (F) per raccogliere l'effluente trattato.

I serbatoi (A) e (F) devono essere di vetro o di idoneo materiale plastico, e della capacità di almeno 24 litri. La pompa (B) alimenta con un flusso costante di liquame sintetico la vasca di aerazione; si può impiegare qualsiasi sistema idoneo purché sia in grado di assicurare il flusso e la concentrazione di alimentazione.

Durante il normale funzionamento, l'altezza del sedimentatore (D) è fissata in modo che il volume delle soluzione chiarificata contenuto nella vasca di aerazione sia di tre litri. Un diffusore di materiale sinterizzato (G) è sospeso nel recipiente (C) al vertice del cono. La quantità di aria insufflata attraverso l'aeratore può essere determinata con un flussometro. La pompa ad aria compressa (E) è regolata in modo che il fango attivo sia riciclato con continuità e regolarità dal sedimentatore al recipiente di aerazione (C).

«Vaso poroso»

Il vaso poroso è realizzato con fogli di polietilene poroso (spessore 2 mm, dimensione massima dei pori 95 µm), a forma cilindrica del diametro di 14 cm e con una base conica a 45° (figure 1 e 2 dell'allegato II). Il vaso poroso è contenuto in un recipiente impermeabile di plastica idonea del diametro di 15 cm, con una luce sulla parte cilindrica ad una altezza di 17,2 cm che determina il volume (tre litri) del vaso. Nella parte superiore del recipiente interno si trova un anello rigido di sostegno in plastica idonea in modo da avere un'intercapedine di efflusso di 0,5 cm fra il recipiente interno e quello esterno.

I vasi porosi possono essere montati sul fondo di un bagnomaria controllato termostaticamente. Alla base del recipiente interno, dove sono collocati idonei diffusori, si ha un'alimentazione di aria.

I recipienti (A) ed (E) debbono essere di vetro o di plastica idonea ed avere una capacità di almeno 24 litri. La pompa (B) alimenta, con un flusso costante di liquame sintetico, il recipiente di aerazione; si può impiegare qualsiasi sistema atto ad assicurare il flusso e la concentrazione di alimentazione.

Sono necessari dei vasi porosi interni di riserva per sostituire quelli che possono ostruirsi durante l'uso; i vasi ostruiti vengono puliti mediante immersione per 24 ore in una soluzione di ipoclorito seguita da un lavaggo accurato con acqua di rubinetto.

1.6.1.2. Filtrazione

Apparecchiatura per filtrazione su membrana e membrane filtranti con pori da 0,45 µm. Le membrane filtranti sono adatte soltanto se non cedono carbonio organico e non assorbono la sostanza durante la filtrazione.

1.6.1.3. Liquame

Si possono impiegare sia un'idonea alimentazione sintetica, sia liquame domestico.

Esempio di alimentazione sintetica

Sciogliere in un litro di acqua di rubinetto i seguenti composti:

Peptone:	160 mg
Estratto di carne:	110 mg
Urea:	30 mg
NaCl:	7 mg
$CaCl_2 \cdot 2H_2O$:	4 mg
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$:	2 mg
K_2HPO_4:	28 mg

Liquame domestico

Dovrebbe essere raccolto fresco ogni giorno dallo stramazzo della vasca di sedimentazione primaria di un impianto che tratta in prevalenza liquami domestici.

1.6.1.4. Soluzione madre della sostanza in esame

Si dovrebbe preparare una soluzione della sostanza in esame, ad esempio all'1 %, da aggiungere nell'unità di prova. È necessario fissare la concentrazione della sostanza in modo tale che si conosca il volume necessario per ottenere la concentrazione di prova da addizionare al liquame o direttamente nell'unità per mezzo di una seconda pompa.

1.6.1.5. Inoculo

Osservazione: Usando liquami domestici, sarebbe superfluo l'impiego di un inoculo a bassa concentrazione batterica, ma si possono usare fanghi attivi.

Possono essere usati svariati inoculi, se ne danno tre esempi adatti:

a) Inoculo da effluente secondario

Si dovrebbe ricavare l'inoculo da un effluente secondario di buona qualità raccolto da un impianto che tratta in prevalenza liquami domestici. Nel periodo compreso fra il campionamento e l'impiego, l'effluente deve essere tenuto in condizioni aerobie. Per preparare l'inoculo, si filtra il campione su filtro a elevata porosità, scartando i primi 200 ml. Il filtrato è mantenuto in condizioni aerobie fino al momento dell'uso. L'inoculo deve essere impiegato il giorno stesso del prelievo. Per l'inoculazione occorre impiegarne almeno 3 ml.

b) Inoculo composto

Inoculo da un *effluente* secondario:

vedi descrizione precedente.

Inoculo da terreno:

si sospendono 100 grammi di terreno (fertile, non sterile) in 1 000 ml di acqua potabile esente da cloro (terreni con un contenuto eccessivo di argilla, sabbia o humus non sono adatti). Dopo agitazione, si lascia riposare la sospensione per 30 minuti. Si filtra il surnatante su carta a elevata porosità, scartando i primi 200 ml. Si sottopone immediatamente il filtrato ad aerazione prolungandola fino al momento dell'uso. L'inoculo deve essere utilizzato il giorno stesso del prelievo.

Inoculo da acque superficiali:

un altro inoculo parziale può ottenersi da acque superficiali semiputride (mesosaprobiche). Si filtra il campione su carta ad elevata porosità, scartando i primi 200 ml. Si mantiene in condizioni aerobie fino al momento dell'impiego. L'inoculo va utilizzato il giorno stesso del prelievo.

Si mettono insieme i volumi dei tre campioni parziali di inoculo, si mescolano bene e si preleva dal miscuglio ottenuto l'inoculo finale. Per l'inoculazione occorre che esso sia di almeno 3 ml.

c) Inoculo da un fango attivo

Si può usare come inoculo un volume (non più di tre litri) di fango attivo (contenuto in solidi sospesi fino a 2,5 g/l) prelevato dalla vasca di aerazione di un impianto che tratta prevalentemente liquami domestici.

1.6.2. *Procedimento*

Il saggio viene eseguito a temperatura ambiente; questa dovrebbe essere mantenuta fra 18 e 25 °C.

Se è il caso, il saggio può essere condotto a una temperatura più bassa (fino a 10 °C): se la sostanza viene degradata, allora non occorrono, di solito, altre operazioni. In caso contrario il saggio deve essere condotto ad una temperatura costante compresa fra 18 e 25 °C.

1.6.2.1. Periodo di avviamento: formazione/stabilizzazione del fango delle unità

Il periodo di formazione/stabilizzazione del fango è il periodo necessario perché la concentrazione dei solidi sospesi del fango attivo ed il funzionamento delle unità pervengano allo stato di regime nelle condizioni operative volute.

Il periodo di avviamento è quello che va dall'istante in cui la sostanza in esame è aggiunta per la prima volta fino all'istante in cui la sua rimozione si stabilizza (valore relativamente costante). Questo periodo non deve superare le sei settimane.

Il periodo di valutazione é di tre settimane a partire dall'istante in cui la rimozione della sostanza in esame raggiunge un valore relativamente costante che è di solito elevato. Per tutte le sostanze che, nelle prime sei settimane, mostrano una degradazione limitata o nulla, si prendono, come periodo di valutazione, le successive tre settimane.

All'inizio si riempie la (le) unità necessaria(e) per una prova con l'inoculo mescolato con l'affluente.

Si mettono allora in funzione l'aeratore [nel caso della unità del saggio di conferma OCSE la pompa ad aria compressa (E)] ed il meccanismo di dosaggio (B).

L'affluente, privo della sostanza da esaminare, deve attraversare il recipiente di aerazione (C) alla velocità di 1 l/h oppure 0,5 l/h; ciò comporta un tempo medio di ritenzione di tre o di sei ore.

La velocità di aerazione dovrebbe essere regolata in modo che il contenuto del recipiente (C) sia mantenuto costantemente in sospensione ed il volume di ossigeno disciolto sia di almeno 2 mg/l.

Va evitata, con mezzi adeguati, la formazione di schiuma. Non si devono usare agenti antischiumogeni che inibiscano il fango attivo.

Il fango accumulatosi nella parte superiore del recipiente di aerazione (C) [per le unità del saggio di conferma OCSE alla base del recipiente di sedimentazione (D) e nel circuito di circolazione] deve essere riportato nella soluzione chiarificata almeno una volta al giorno con l'uso di una spazzola o di qualche altro mezzo appropriato.

Quando il fango ha difficoltà a sedimentare, se ne può aumentare la densità aggiungendo delle porzioni di 2 ml di una soluzione al 5 % di cloruro ferrico e ripetendo l'operazione quando necessario.

Si raccoglie l'effluente nel recipiente (E o F) per 20-24 ore e si preleva un campione dopo un'accurata miscelazione. Il recipiente (E o F) deve essere pulito molto bene.

Per poter determinare e controllare l'efficienza del processo, si misurano almeno due volte alla settimana la domanda chimica di ossigeno (COD) o il carbonio organico disciolto (DOC) del filtrato dell'effluente raccoltosi, come pure del filtrato dell'affluente (usando una membrana con pori di 0,45 μm e scartando i primi 20 ml circa di filtrato).

La riduzione del COD o DOC dovrebbe annullarsi quando si ottiene una degradazione giornaliera abbastanza regolare.

Due volte alla settimana si dovrebbe determinare la quantità (in g/l) di sostanza secca del fango attivo nel recipiente di aerazione. Le unità possono funzionare in due modi: o due volte per settimana si determina la quantità di sostanza secca presente nel fango attivo e se essa supera i 2,5 g/l si deve togliere quella in eccesso; oppure si eliminano giornalmente da ciascun vaso 500 ml di soluzione mista per avere un tempo di ritenzione medio del fango di 6 giorni.

Quando i parametri misurati e calcolati [efficienza del processo (nella rimozione COD o DOC), concentrazione del fango, capacità di sedimentazione del fango, torbidità degli effluenti, ecc.] delle due unità sono sufficientemente stazionari, la sostanza in esame può essere introdotta nell'affluente di una delle unità, secondo il punto 1.6.2.2.

In alternativa, la sostanza in esame può essere introdotta all'inizio del periodo di formazione del fango, specialmente quando come inoculo si aggiunge fango.

1.6.2.2. Procedimento

Si mantengono le condizioni di funzionamento del periodo di avviamento e si aggiunge all'affluente dell'unità di prova una quantità sufficiente (circa l'1%) di soluzione madre del prodotto in esame, in modo da ottenere nel liquame la concentrazione voluta del prodotto (circa 10-20 mg DOC/l o 40 mg COD/l). Ciò si può effettuare o miscelando giornalmente il liquame con la soluzione madre, oppure con un sistema separato di pompaggio. Detta concentrazione può essere raggiunta progressivamente. Se non si hanno effetti tossici della sostanza in esame sul fango attivo, possono essere provate anche concentrazioni più elevate.

L'unità «in bianco» è alimentata soltanto con l'affluente senza aggiunta di sostanze. Per l'analisi si prendono adeguate quantità di effluente e si filtrano con filtri a membrana (0,45 µm) scartando i primi 20 ml (circa) di filtrato.

I campioni filtrati devono essere analizzati il giorno stesso, in caso contrario vanno opportunamente conservati, per esempio mediante l'aggiunta di 0,05 ml di una soluzione all'1% di cloruro mercurico ($HgCl_2$) per ogni 10 ml di campione filtrato, oppure mantenendoli alla temperatura da 2 a 4 °C per 24 ore al massimo, oppure al di sotto di − 18 °C per periodi più lunghi.

Il periodo di sperimentazione, a partire dall'aggiunta della sostanza in esame, non dovrebbe superare le sei settimane ed il periodo di valutazione dovrebbe durare almeno tre settimane; per il calcolo del risultato finale dovrebbero potersi effettuare da 14 a 20 determinazioni.

Processo a unità accoppiate

L'accoppiamento delle unità si ottiene scambiando, una volta al giorno, fra le due unità, 1,5 litri di soluzione chiarificata (fango incluso) proveniente dalle vasche di aerazione del fango attivo. Nel caso di prodotti in esame fortemente assorbenti, si prelevano dalle vasche di sedimentazione 1,5 litri del solo liquido surnatante e si versano nella vasca di fango attivo dell'altra unità.

1.6.2.3. Analisi

Per seguire il comportamento della sostanza si possono effettuare due tipi di analisi:

— DOC e COD:

le concentrazioni di DOC sono determinate in doppio con l'analizzatore di carbonio e quelle di COD (assieme o in alternativa) col sistema indicato nel riferimento bibliografico (2);

— analisi specifica:

le concentrazioni della sostanza esaminata si determinano con un metodo analitico idoneo. Se possibile, si dovrebbe effettuare una determinazione specifica della sostanza assorbita sul fango.

2. DATI E VALUTAZIONE

2.1. Processo ad unità accoppiate

Quando si impiega il «processo ad unità accoppiate», il grado giornaliero di rimozione DR viene calcolato come indicato al punto 1.2.1. Il valore DR viene quindi corretto in DRc, per tener conto del trasferimento di sostanza dovuto al procedimento di transinoculazione, mediante l'equazione (2) e l'equazione (3) per tempi medi di ritenzione rispettivamente di tre e di sei ore.

$$DRc = \frac{8}{7} DR - \frac{100}{7} \qquad [2]$$

$$DRc = \frac{4}{3} DR - \frac{100}{3} \qquad [3]$$

Si calcola la media della serie di valori di DRc ed inoltre la deviazione standard con l'equazione [4]

$$S_{DRc} = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^{n} (\overline{DRc} - DRc_i)^2}{n-1}} \qquad [4]$$

dove:

S_{DRc} = deviazione standard della serie di valori di DRc

$\overline{DRc}$ = media dei valori di DRc

n = numero di determinazioni

Si eliminano i valori anomali della serie di DRc secondo un opportuno procedimento statistico, ad esempio Nalimov (6), con un livello di probabilità del 95 % e si ricalcolano la media e la deviazione standard della serie di DRc priva di valori anomali (outliers).

Si calcola quindi il risultato finale con l'equazione (5):

$$DRc = \overline{DRc} \pm \frac{t_{n-1;\alpha}}{\sqrt{n}} S_{DRc} \qquad [5]$$

dove:

$t_{n-1;\alpha}$ = valore tabulato di t per n coppie di valori di E ed E_0 e l'intervallo fiduciario P (P = 1 − α) è stimato al 95 % (1)

Il risultato viene espresso come media con limiti di tolleranza al 95 %, relativa deviazione standard e numero di dati della serie DRc priva di «outliers» e numero di valori anormali, ad esempio:

DRc = 98,6 ± 2,3% della rimozione del DOC

s = 4,65 % della rimozione del DOC

n = 18

x = numero degli «outliers»

2.2. **Processo ad unità non accoppiate**

Il funzionamento delle unità può essere verificato come segue:

$$\text{percentuale di rimozione del COD o del DOC} = \frac{\text{COD o DOC del liquame} - \text{COD o DOC dell'effluente}}{\text{COD o DOC del liquame}} \times 100$$

Questa rimozione giornaliera può essere riportata in grafico per evidenziare eventuali andamenti, per esempio, verso l'acclimatazione.

2.2.1. *Determinazioni attraverso il COD/DOC*

Il grado giornaliero di rimozione DR è calcolato come indicato al punto 1.2.1.

Si calcola la media della serie di valori DR ed inoltre la sua deviazione standard con l'equazione:

$$S_{DR} = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^{n} (\overline{DR} - DR_i)^2}{n-1}} \qquad [6]$$

dove:

S_{DR} = deviazione standard della serie di valori di DR_i

$\overline{DR}$ = media dei valori DR_i

n = numero delle determinazioni

Si eliminano gli «outliers» della serie di DR secondo un opportuno procedimento statistico, ad esempio Nalimov (6), con un livello di probabilità del 95 % e si ricalcolano la media e la deviazione standard della serie di DR così epurata.

Il risultato finale è quindi calcolato con l'equazione:

$$DR = \overline{DR} \pm \frac{t_{n-1;\alpha}}{\sqrt{n}} S_{DR} \qquad [7]$$

dove:

$t_{n-1;\alpha}$ = valore tabulato di t per n coppie di valori di E ed E_O e l'intervallo fiduciario P (P = 1 − α) dove P è stimato al 95 %(1)

Come risultato vengono presi la media, con limiti di tolleranza ad un livello di probabilità del 95 %, la relativa deviazione standard, il numero di dati della serie DR epurata ed il numero di valore anomali, ad esempio:

DR = (98,6 ± 2,3 %) della rimozione del DOC

s = 4,65 % della rimozione del DOC

n = 18

x = numero di «outliers»

2.2.2. *Determinazione attraverso l'analisi specifica*

La percentuale di eliminazione della sostanza in esame dalla fase acquosa (R_w) è calcolata come indicato al punto 1.2.2.

3. RELAZIONE

3.1. Relazione sul saggio

Nella relazione sul saggio devono figurare, se possibile:

- la scheda fornita nell'allegato III, che mostra le condizioni operative del saggio,
- l'apparecchiatura scelta (prova di conferma OCSE o vaso poroso),
- il procedimento scelto: unità accoppiate o meno,
- il liquame impiegato: sintetico o domestico (nel caso di liquame domestico, data e provenienza del campione),
- tipo di inoculo, con data e provenienza del campione,
- una descrizione del metodo analitico, se sono state effettuate analisi specifiche,
- grafico della rimozione di COD o DOC in funzione del tempo, comprensivo dei periodi di avviamento e di valutazione,
- recupero analitico della sostanza in esame come COD o DOC nella soluzione madre,
- nel caso siano state effettuate analisi specifiche, grafico della rimozione percentuale della sostanza esaminata dalla fase acquosa in funzione del tempo (periodo di avviamento e di valutazione),
- la rimozione media di DOC, COD o della sostanza in esame e la deviazione standard sono calcolate dai risultati del periodo di valutazione, cioè quando si ha una rimozione stazionaria della sostanza in esame o un periodo di funzionamento a regime,
- grafico della concentrazione del fango attivo in funzione del tempo,
- osservazioni riguardano il fango attivo (scarto di fanghi in eccesso, presenza di rigonfiamento, $FeCl_3$, ecc.),
- concentrazione della sostanza usata nel saggio,
- tutti i risultati relativi all'analisi fatta sul fango,
- tutti i dati ed i risultati sperimentali relativi alla sostanza in esame e a quella di riferimento, se impiegata,
- motivazioni scientifiche per eventuali modifiche nel procedimento.

3.2. Interpretazione dei risultati

Una bassa rimozione della sostanza esaminata dalla fase acquosa può essere dovuta all'inibizione dei microorganismi da parte della sostanza in esame. Ciò può anche essere evidenziato da lisi e perdita di fango, che produce un surnatante torbido e da un abbassamento dell'efficienza di rimozione COD (o DOC) dell'impianto pilota.

A volte può svolgere un ruolo l'assorbimento fisico-chimico. Le differenze fra l'azione biologica sulla molecola e l'assorbimento chimico-fisico possono essere rivelati da un'analisi condotta sul fango dopo un adeguato desorbimento.

Se si deve fare la distinzione fra biodegradazione (o parziale biodegradazione) ed assorbimento, sono necessarie ulteriori prove. Ciò si può effettuare in diversi modi, ma il più convincente è usare il surnatante come inoculo in un saggio del dossier di base (preferibilmente un saggio respirometrico).

Se si osservano elevate rimozioni DOC o COD, ciò è dovuto alla biodegradazione, mentre a basse rimozioni la biodegradazione non si può distinguere dall'eliminazione. Ad esempio, se un composto solubile manifesta una elevata costante di assorbimento del 98 % ed il tasso di eliminazione giornaliero del surplus di fango è del 10 %, è possibile un'eliminazione sino al 40 %; con un tasso di eliminazione del surplus di fango del 30 %, l'eliminazione dovuta all'assorbimento ed alla rimozione attraverso il surplus di fango può arrivare fino al 65 % (4).

Quando si effettuano analisi specifiche, occorrerebbe fare attenzione alla relazione fra la struttura della sostanza e l'analisi specifica impiegata. In questo caso il fenomeno osservato non può essere interpretato come una mineralizzazione della sostanza.

4. BIBLIOGRAFIA

(1) OCSE, Parigi 1981, *Linea Guida 303 A*, decisione C(81) 30 def. del Consiglio.

(2) Allegato V C. 9: Degradation — Chemical Oxygen Demand, direttiva 84/449/CEE della Commissione; *Gazzetta ufficiale delle Comunità europee* n. L 251 del 19 settembre 1984.

(3) Painter, H. A., King, E. F., WRC *Porous-Pot method for assessing biodegradability*. Technical Report TR70, giugno 1978, Water Research Center, Regno Unito.

(4) Wierich, P., Gerike, P., «The fate of soluble, recalcitrant, and adsorbing compounds in activated sludge plants», *Ecotoxicology and Environmental Safety*, Vol. 5, n. 2, giugno 1981, pagine da 161 a 171.

(5) Direttive 82/242/CEE e 82/243/CEE del Consiglio (*Gazzetta ufficiale delle Comunità europee* n. L 109 del 22 aprile 1982), modificate delle direttive 73/404/CEE e 73/405/CEE del Consiglio; Biodegradability of detergents, *Gazzetta ufficiale delle Comunità europee* n. L 347 del 17 dicembre 1973.

(6) Streuli, H., Fehlerhafte Interpretation und Anwendung von Ausreissertests, insbesondere bei Ringversuchen zur Überprüfung analytischer-chemischer Untersuchungsmethoden, *Fresenius-Zeitschrift für Analytische Chemie*, 303 (1980) pagine da 406 a 408.

Appendice 1

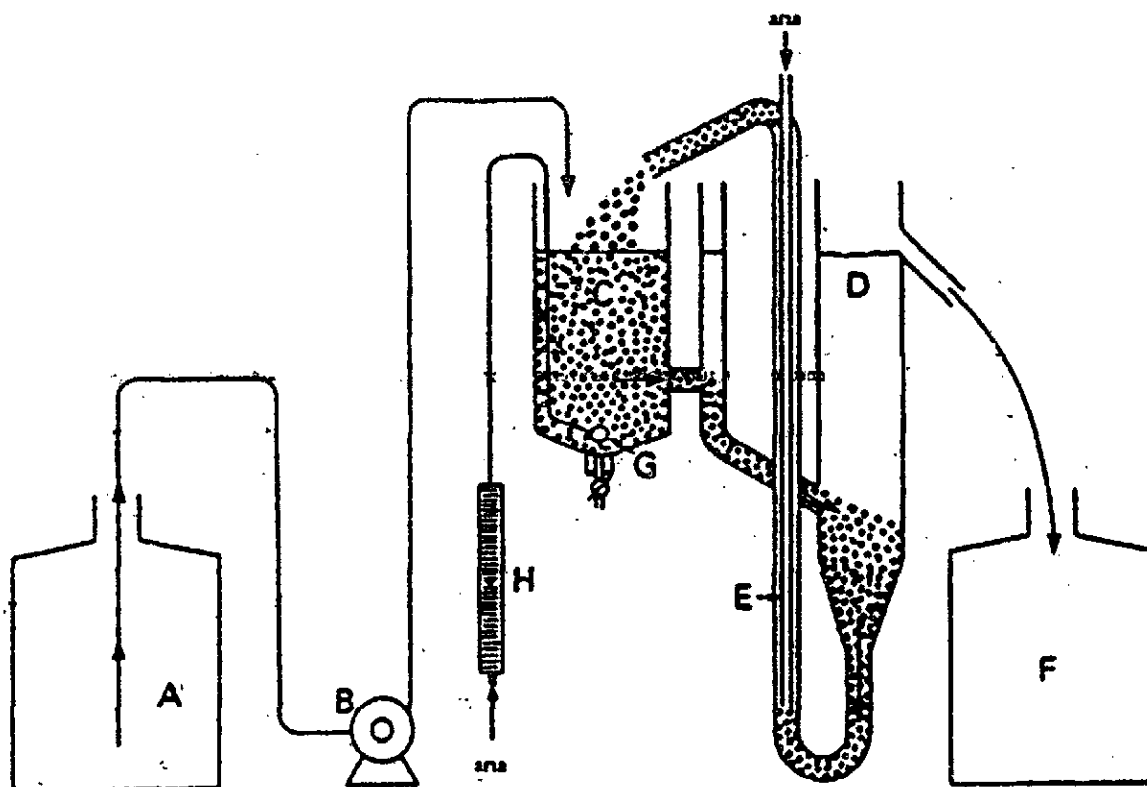



Figura 1

A = serbatoio;
B = pompa di dosaggio;
C = vasca di aerazione (capacità 3 litri);
D = vasca di sedimentazione;
E = pompa ad aria compressa;
F = recipiente di raccolta;
G = aeratore;
H = flussometro (facoltativo).

Figura 2

PVC rigido
materiale: vetro o plastica impermeabile (PVC rigido)
livello del liquido
PVC rigido

Appendice 2

Figura 1

Attrezzatura per la determinazione della biodegradabilità

A = serbatoio;
B = pompa di dosaggio;
C = recipiente poroso di aerazione;
D = recipiente esterno impermeabile;
E = recipiente di raccolta dell'effluente;
F = diffusore/aeratore;
G = flussometro (facoltativo).

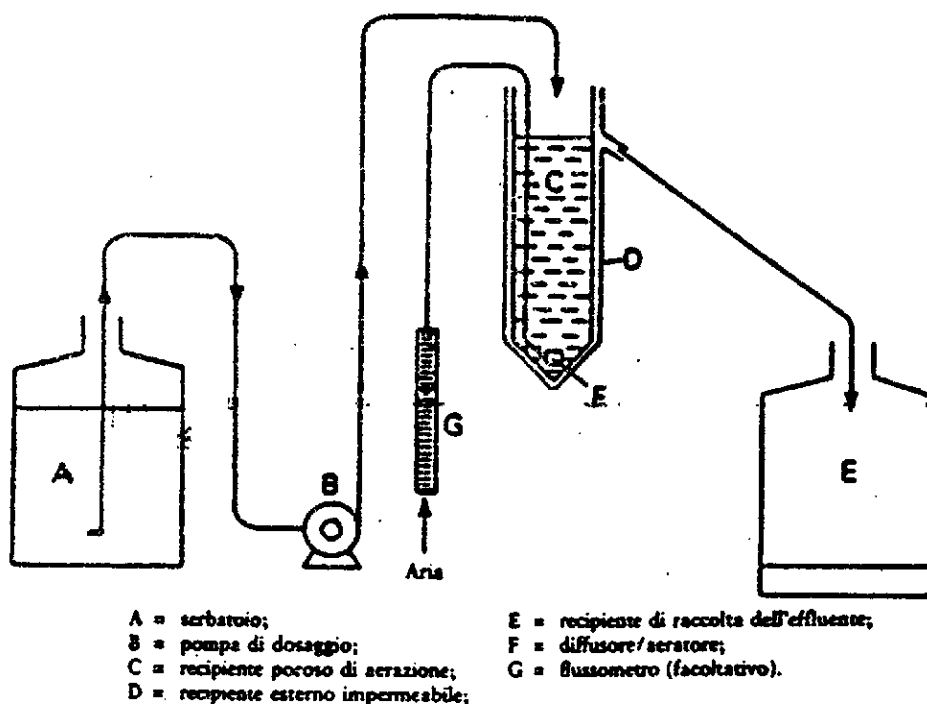
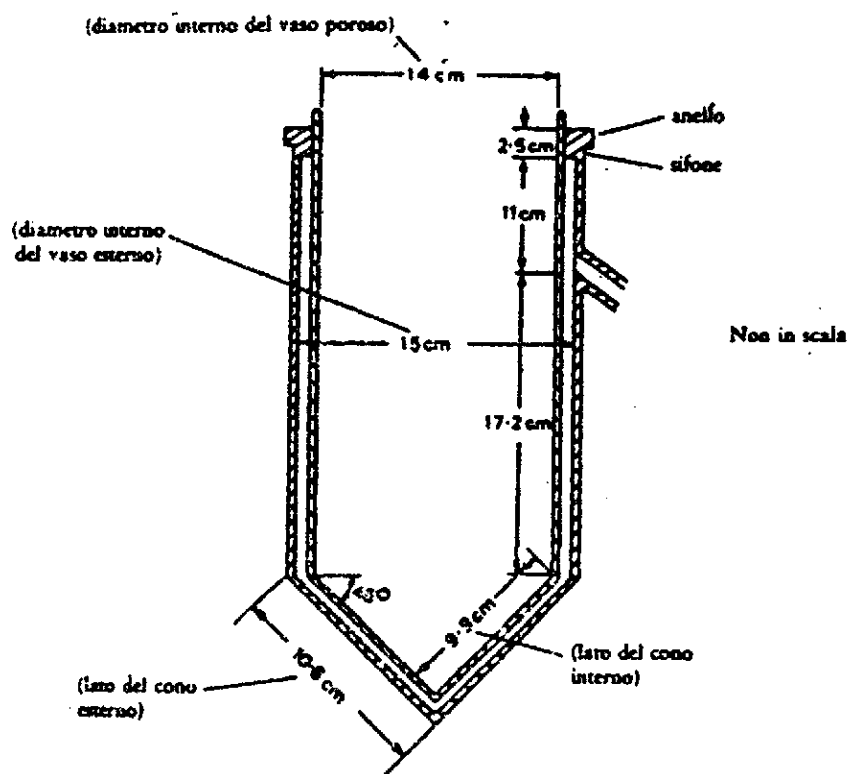



Figura 2

Dettagli del recipiente di aerazione a vaso poroso di 3 litri

Appendice 3

Condizioni operative per la prova di simulazione con fanghi attivi

Controllo in ciascun gruppo

Attrezzature

di conferma OCSE ☐
vaso poroso ☐

Funzionamento

singola unità ☐
unità accoppiate ☐
unità non accoppiate ☐

Transinoculazione

nessuna ☐
fango attivo ☐
surnatante ☐

Tempo medio di ritenzione

tre ore ☐
sei ore ☐

Base nutritiva

liquame domestico ☐
liquame sintetico ☐

Inoculo

effluente secondario ☐
composto ☐
fango attivo ☐

Addizione del materiale da esaminare

dall'avviamento ☐
addizione graduale ☐
a formazione del fango avvenuta ☐

Analisi

specifica ☐
COD ☐
DOC ☐

BIODEGRADAZIONE

FANGHI ATTIVI: SAGGIO DI INIBIZIONE DELLA RESPIRAZIONE

1. METODO

1.1. Introduzione

Con il metodo qui descritto si valuta l'effetto della sostanza in esame sui microorganismi misurando la velocità di respirazione in determinate condizioni alla presenza di diverse concentrazioni della sostanza stessa.

Il metodo ha lo scopo di fornire un procedimento rapido di «screening» per l'identificazione delle sostanze che possono avere effetti nocivi sugli impianti di trattamento batterico aerobio e per indicare le concentrazioni della sostanza in esame, che non provocano effetti inibitori, da usare nei saggi di biodegradabilità.

Si può fare precedere la prova definitiva da una prova orientativa che consenta di avere delle informazioni sull'intervallo di concentrazioni da usare nel saggio.

Nel programma del saggio vengono inclusi due controlli senza la sostanza da esaminare, da utilizzare uno all'inizio e l'altro alla fine della serie di saggi. Ciascun gruppo di fanghi attivi dovrebbe essere anche controllato con una sostanza di riferimento.

Il presente metodo si applica più facilmente a quelle sostanze che grazie alla loro idrosolubilità ed alla loro bassa volatilità, permangano prevalentemente in acqua.

Per le sostanze che hanno invece una limitata solubilità nei mezzi di trattamento, può non essere possibile determinare la EC_{50}.

Quando la sostanza in esame ha tendenza a disaccoppiare la fosforilazione ossidativa, i risultati basati sull'assunzione di ossigeno possono condurre ad errate conclusioni.

Per eseguire il saggio è utile disporre delle seguenti informazioni:

— idrosolubilità,

— tensione di vapore,

— formula di struttura,

— grado di purezza della sostanza in esame.

Raccomandazione:

i fanghi attivi possono contenere organismi potenzialmente patogeni e dovrebbero perciò essere maneggiati con cautela.

1.2. Definizioni e unità

La velocità di respirazione è il consumo di ossigeno da parte di microrganismi del fango aerobio di acque reflue ed è espresso generalmente in mg di O_2 per mg di fango per ora.

Per calcolare l'effetto inibitorio della sostanza in esame ad una data concentrazione, la velocità di respirazione si esprime come percentuale della media delle velocità di respirazione dei due controlli:

$$\left(1 - \frac{2\,Rs}{Rc_1 + Rc_2}\right) \times 100 = \text{percentuale di inibizione}$$

dove:

Rs = velocità di consumo di ossigeno alla concentrazione saggiata della sostanza in esame

Rc_1 = velocità di consumo di ossigeno nel controllo 1,

Rc_2 = velocità di consumo di ossigeno nel controllo 2.

EC_{50} è, in questo metodo, la concentrazione della sostanza in esame alla quale la velocità di respirazione risulta pari al 50% di quella rilevata nel controllo nelle condizioni qui descritte.

1.3. Sostanze di riferimento

Per controllare che la sensibilità del fango sia normale si raccomanda di usare come sostanza di riferimento il 3,5 diclorofenolo, noto come inibitore della respirazione, e di sottoporlo a determinazione della EC_{50} in ciascun gruppo di fanghi attivi.

1.4. Principio del metodo

La velocità di respirazione di un fango attivo, alimentato con una quantità standard di liquame sintetico, è misurato dopo un tempo di contatto di 30 minuti o/e di 3 ore. Si misura anche la velocità di respirazione dello stesso fango attivo in presenza di diverse concentrazioni della sostanza in esame in condizioni per il resto identiche. L'effetto inibitorio della sostanza in esame ad una data concentrazione è espresso come percentuale delle velocità medie di respirazione dei due controlli. Dalle determinazioni a diverse concentrazioni si calcola un valore della EC_{50}.

1.5. Criteri di qualità

I risultati del saggio sono validi se:

— la velocità di respirazione dei controlli differiscono entro il 15 %

— la EC_{50} (30 minuti e/o 3 ore) del 3,5-diclorofenolo cade nell'intervallo accettato compreso fra 5 e 30 mg/l.

1.6. Descrizione del metodo

1.6.1. *Reagenti*

1.6.1.1. Soluzioni della sostanza in esame

Le soluzioni della sostanza in esame vengono preparate all'inizio dello studio impiegando una soluzione madre. Se si segue il procedimento di cui sotto, è opportuno che la concentrazione delle soluzione madre sia di 0,5 g/l.

1.6.1.2. Soluzione della sostanza de riferimento

Si può preparare ad esempio una soluzione di 3,5-diclorofenolo sciogliendone 0,5 g in 10 ml di NaOH 1M, diluendo quindi con acqua distillata sino a circa 30 ml, addizionando (mentre si agita) H_2SO_4 0,5M sino al punto di precipitazione incipiente — occorreranno circa 8 ml di H_2SO_4 0,5M — e diluendo infine la miscela con acqua distillata sino al volume di 1 litro. Il pH dovrebbe allora avere un valore compreso fra 7 e 8.

1.6.1.3. Liquame sintetico

Una alimentazione di liquame sintetico si ottiene sciogliendo in un litro di acqua le seguenti sostanze nelle quantità precisate:

— 16 g di peptone,

— 11 g di estratto di carne,

— 3 g di urea,

— 0,7 g di NaCl,

— 0,4 g di $CaCl_2 \cdot 2H_2O$,

— 0,2 g di $MgSO_4 \cdot 7H_2O$,

— 2,8 g di K_2HPO_4.

Nota 1: Questo liquame sintetico è 100 volte più concentrato di quello descritto in OECD Technical Report, «Metodo proposto per la determinazione della biodegradabilità dei tensioattivi impiegati nei detersivi sintetici» (11 giugno 1976), con l'aggiunta di fosfato acido di potassio.

Nota 2: La soluzione preparata, se non viene utilizzata subito, dovrà essere conservata al buio a temperature comprese tra 0 °C e 4 °C per non oltre una settimana, in condizioni tali da non subire alterazioni nella composizione. Inoltre, prima della conservazione la soluzione potrà essere sterilizzata oppure si potranno aggiungere il peptone e l'estratto di carne solo poco prima di effettuare l'analisi. Prima dell'uso la soluzione dovrà essere agitata ed il suo pH dovrà essere corretto.

1.6.2. *Apparecchiatura*

Apparecchiatura di misurazione: non è importante che l'apparecchio abbia una forma precisa. Comunque, la bottiglia di misurazione dovrebbe essere completamente piena e la sonda dovrebbe aderire ermeticamente al collo.

È necessaria la normale dotazione di laboratorio ed in particolare:

— apparecchio di misurazione,

— sistema di aerazione,

— elettrodo per pH e relativa apparecchiatura di misurazione,

— elettrodo ad ossigeno.

1.6.3. *Preparazione dell'inoculo*

Come inoculo batterico per il saggio si impiega fango attivo proveniente da un impianto di trattamento di liquami prevalentemente domestici.

Se necessario, al ritorno in laboratorio, si possono rimuovere le particelle grossolane mediante sedimentazione per un breve periodo ad esempio per 15 minuti, e, quindi, decantare, per l'uso, lo strato superficiale contenente le particelle solide più piccole. In alternativa il fango può essere miscelato per pochi secondi con un agitatore.

Inoltre, ove si presume la presenza di materiali inibenti, il fango dovrebbe essere lavato con acqua di rubinetto o con soluzione isotonica. Dopo centrifugazione si decanta il surnatante (questo procedimento si ripete per tre volte).

Una piccola quantità di fango umido viene pesata, essiccata e ripesata. In questo modo si può calcolare la quantità di fango umido da sospendere in acqua per ottenere un fango attivo con una quantità di solidi sospesi nel liquido chiarificato compresa tra 2 e 4 gr/l. Questa quantità dà una concentrazione compresa tra 0,8 e 1,6 g/l nel mezzo utilizzato per il saggio, se si segue la procedura raccomandata più sotto.

Se il fango non può essere utilizzato il giorno stesso del prelievo, ad ogni litro del fango attivo preparato come sopra si aggiungono 50 ml di liquame sintetico; il fango viene quindi aerato per tutta la notte a 20 °C (± 2 °C). L'aerazione viene mantenuta anche durante la giornata in attesa dell'uso prima del quale si controlla e, se necessario, si tampona il pH fra 6 e 8. I solidi sospesi nel liquido chiarificato si dovrebbero determinare come descritto nel precedente paragrafo.

Se si deve impiegare lo stesso gruppo di fanghi nei giorni successivi (quattro giorni al massimo), alla fine di ogni giornata di lavoro occorrerà aggiungere altri 50 ml di liquame sintetico, per litro di fango.

1.6.4. *Esecuzione del saggio*

Durata/tempo di contatto:	30 minuti e/o 3 ore, sotto aerazione;
Acqua:	acqua potabile (se necessario declorata);
Alimentazione di aria:	aria pulita, esente da oli; flusso da 0,5 a 1 l/min;
Apparecchiatura di misurazione:	bottiglia a fondo piatto del tipo della bottiglia per la determinazione del BOD;
Ossimetro:	idoneo elettrodo ad ossigeno con registratore;
Soluzione nutritiva:	liquame sintetico (vedi sopra);
Sostanza in esame:	la soluzione in esame è preparata in concomitanza all'inizio del saggio;
Sostanza di riferimento:	ad esempio 3,5-diclorofenolo (almeno tre concentrazioni);
Controlli:	campioni inoculati esenti dalla sostanza in esame;
Temperatura:	20 °C (± 2 °C).

Si descrive in seguito un procedimento sperimentale che può essere seguito sia per la sostanza in esame che per quella di riferimento durante il periodo di contatto di tre ore.

Occorrono diversi recipienti (ad esempio becher da 1 litro). Si dovrebbe impiegare una serie di almeno cinque concentrazioni che differiscano tra di loro di un fattore costante di preferenza non superiore a 3,2.

Al tempo «0», si portano 16 ml di liquame sintetico a 300 ml con acqua. Si aggiungono 200 ml di inoculo batterico e si versa la miscela totale (500 ml) in un primo recipiente (primo controllo C_1).

I recipienti in esame dovrebbero essere aerati continuativamente in modo da impedire che il livello di O_2 disciolto scenda al di sotto di 2,5 ml/l ed in modo che, subito prima di misurare la velocità di respirazione, la concentrazione di O_2 sia almeno uguale a 6,5 mg/l.

Al tempo «15 minuti» (15 minuti è un intervallo arbitrario ma adeguato) si ripete la stessa operazione salvo che 100 ml della soluzione madre della sostanza in esame vengono aggiunti ai 16 ml di liquame sintetico prima di addizionare l'acqua sino a 300 ml e l'inoculo batterico sino al volume di 500 ml. Questa miscela viene quindi versata in un secondo recipiente ed aerata come sopra. Si ripete questo procedimento ad intervalli di 15 minuti con differenti volumi della soluzione madre della sostanza in esame, in modo da disporre di una serie di recipienti contenenti diverse concentrazioni della sostanza in esame. Infine si prepara un secondo controllo (C_2).

Dopo tre ore si determina il pH e si versa un'aliquota ben miscelata del contenuto del primo recipiente nell'apparecchio di misurazione e si misura la velocità di respirazione per un tempo fino a 10 minuti.

Questa determinazione viene ripetuta sul contenuto di ciascun recipiente ad intervalli di 15 minuti, in modo che il tempo di contatto per ogni recipiente sia di tre ore.

La sostanza di riferimento viene saggiata nello stesso modo su ciascun gruppo di inoculi batterici.

Quando si devono effettuare misurazioni dopo 30 minuti di contatto, occorre un procedimento diverso (ad esempio con più di un ossimetro).

Se si richiede la misura del consumo di ossigeno, si preparano altre bottiglie contenenti la sostanza in esame, il liquame sintetico ed acqua ma non fango attivo.

Il consumo di ossigeno si misura e registra dopo un periodo di aerazione di 30 minuti e/o 3 ore (tempo di contatto).

2. DATI E VALUTAZIONE

La velocità di respirazione si calcola dal tracciato del registratore nell'intervallo che va da circa 2,5 a 6,5 mg O_2/l, oppure, se la velocità di respirazione è bassa, per un periodo di 10 minuti. Il tratto di curva di respirazione in cui si misura la velocità di respirazione dovrebbe essere lineare.

Se le velocità di respirazione dei due controlli differiscono tra loro di più del 15 % o se la EC_{50} (30 minuti e/o 3 ore) della sostanza di riferimento non cade nell'intervallo ammesso (da 5 a 30 mg/l per il 3,5-diclorofenolo), la prova non è valida e deve essere ripetuta.

Per ogni concentrazione in esame si calcola la percentuale di inibizione (vedi paragrafo 1.2). Quest'ultima viene riportata in grafico, su carta lognormale (o logprobit), in funzione della concentrazione e si ricava un valore di EC_{50}.

Usando procedimenti standard si possono determinare i limiti di confidenza al 95% per i valori della EC_{50}.

3. RELAZIONE

3.1. Relazione sul saggio

Nella relazione sul saggio devono figurare, se possibile:

- Sostanza in esame: dati di identificazione chimica.
- Sistema di saggio: origine, concentrazione ed eventuali trattamenti preliminari del fango attivo.
- Condizioni del saggio:
  - pH della miscela in esame prima di determinare la respirazione;
  - temperatura;
  - durata;
  - sostanza di riferimento e relativa EC_{50} misurata;
  - eventuale assunzione abiotica di ossigeno.
- Risultati:
  - tutti i dati misurati;
  - curva di inibizione e metodo per il calcolo della EC_{50}.
  - EC_{50} e, se possibile, limiti di confidenza al 95%, EC_{20} ed EC_{80}.
  - tutte le osservazioni e le eventuali deviazioni dal presente metodo che potrebbero aver condizionato il risultato.

3.2. Interpretazione dei dati

Dal momento che le complesse interazioni che si hanno nell'ambiente non possono essere fedelmente riprodotte in un saggio di laboratorio, il valore della EC_{50} dovrebbe essere considerato semplicemente come una indicazione della probabile tossicità della sostanza in esame per il fango attivo usato nel trattamento dei liquami o per i microorganismi delle acque reflue.

Inoltre, le sostanze in esame aventi effetto inibitorio sull'ossidazione dell'ammoniaca possono anche causare curve di inibizione atipiche. Di conseguenza tali curve dovranno essere interpretate con cautela.

4. BIBLIOGRAFIA

(1) International Standard ISO/8192 — 1986.

(2) Broecker, B. e Zahn, R., *Water Research* 11, (1977), pagina 165.

(3) Brown, D., Hitz, H. R. e Schaefer, L., *Chemosphere* 10, (1981), pagina 245.

(4) ETAD (Ecological and Toxicological Association of Dyestuffs Manufacturing Industries) *Recommended Method N. 103*, descritto anche in:

(5) Robra, B., *Wasser/Abwasser* 117, (1976), pagina 80.

(6) Schefer, W., *Textilveredelung* 6, (1977), pagina 247.

(7) OCSE, Parigi 1981, *Linea Guida 209*, decisione C(81) 30 def. del Consiglio.

BIODEGRADAZIONE

SAGGIO SCAS MODIFICATO

1. METODO

1.1. Introduzione

Scopo del metodo è quello di valutare la potenziale biodegradabilità ultima di sostanze organiche solubili in acqua e non volabili, esposte per un lungo periodo a concentrazioni relativamente elevate di microorganismi. La vitalità dei microorganismi viene mantenuta per tutto il periodo aggiungendo giornalmente liquami decantati. (Per l'intervallo di fine settimana, i liquami possono essere conservati a 4 °C. In alternativa si può usare il liquame sintetico del saggio di conferma OCSE.)

Nell l'interpretazione dei risultati occorre tenere conto dell'eventuale assorbimento fisico-chimico della sostanza in esame sui solidi in sospensione (vedi paragrafo 3.2).

A causa del lungo periodo di ritenzione della fase liquida (36 ore) e dell'aggiunta, intermittente di nutrienti, la prova non riproduce le stesse condizioni che si hanno in un impianto per il trattamento dei liquami. I risultati ottenuti con diverse sostanze indicano che il sistema ha un elevato potenziale di biodegradazione.

Le condizioni sperimentali sono estremamente favorevoli alla selezione e/o all'adattamento di microorganismi capaci di degradare il composto in esame (si può seguire questo procedimento anche per produrre inoculi acclimatati da utilizzare in altri saggi).

Nel presente metodo la biodegradabilità ultima delle sostanze in esame viene determinata attraverso la misura della concentrazione del carbonio organico disciolto (DOC) (è preferibile determinare il DOC dopo acidificazione e depurazione anziché dalla differenza C_{totale}—$C_{inorganico}$).

L'impiego simultaneo di un metodo analitico specifico consente di determinare la degradazione primaria della sostanza (modifica della struttura chimica della sostanza in esame).

Il metodo può essere applicato soltanto alle sostanze organiche che alle concentrazioni impiegate per il saggio:

— sono solubili in acqua (almeno 20 mg/l di carbonio organico disciolto),

— hanno una tensione di vapore trascurabile,

— non esercitano effetti inibitori sui batteri,

— non vengono assorbite in modo significativo dal sistema sperimentale,

— non vengono sottratte alla soluzione in esame mediante formazione di schiume.

Occorre determinare il contenuto di carbonio organico della sostanza in esame.

Per l'interpretazione dei risultati ottenuti, in particolare nei casi in cui i valori siano bassi o trascurabili, sarà utile disporre di informazioni sulle proporzioni relative dei principali componenti della sostanza in esame.

Per l'interpretazione di eventuali valori bassi e per la scelta di una concentrazione adeguata al saggio, può essere utile disporre di informazioni sulla tossicità della sostanza per i microorganismi.

1.2. Definizioni e unità

C_T = concentrazione della sostanza in esame espressa come carbonio organico presente o addizionato al liquame sedimentato all'inizio del periodo di aerazione (mg/l)

C_t = concentrazione del carbonio organico disciolto rinvenuto nel surnatante del saggio alla fine del periodo di aerazione (mg/l)

C_c = concentrazione del carbonio organico disciolto rinvenuto nel surnatante del controllo alla fine del periodo di aerazione (mg/l)

Nel presente metodo la biodegradazione è definita come eliminazione del carbonio organico. La biodegradazione può essere espressa come:

1) la rimozione percentuale D_{da} della sostanza aggiunta giornalmente:

$$D_{da} = \frac{C_T - (C_t - C_c)}{C_T} \times 100 \qquad [1]$$

dove:

D_{da} = degradazione/aggiunta giornaliera.

2) la rimozione percentuale D_{sd} di sostanza rispetto a quella presente all'inizio di ogni giorno:

$$D_{sd} = \frac{2C_T + C_{ti} - C_{ci} - 3C_{t(i+1)} + 3C_{c(i+1)}}{2C_T + C_{ti} - C_{ci}} \times 100 \qquad [2\ a)]$$

$$= \frac{2C_T - 2C(C_t - C_c)}{2C_T + (C_t - C_c)} \times 100 \qquad [2\ b)]$$

dove:

D_{sd} = degradazione/sostanza iniziale giornaliera.

Gli indici i e (i + 1) si riferiscono al giorno in cui si effettua la misurazione. L'equazione (2 a) è consigliata se il DOC dell'effluente varia giornalmente mentre l'equazione (2 b) può essere usata quando il DOC dell'effluente rimane relativamente costante da un giorno all'altro.

1.3. Sostanze di riferimento

In alcuni casi quando si esamina una nuova sostanza, possono essere utili delle sostanze di riferimento; ciò nonostante non si propongono qui sostanze di riferimento specifiche.

Nell'allegato I vengono forniti dati relativi a numerosi composti analizzati in un saggio interlaboratorio soprattutto per consentire di tanto in tanto la calibrazione del metodo e per rendere possibile il confronto dei risultati quando se ne adotta un altro.

1.4. Principio del metodo

I fanghi attivi provenienti da un impianto di trattamento dei liquami vengono posti in una unità semicontinua per fanghi attivi (SCAS). Si aggiungono il composto in esame e liquame domestico sedimentato; si effettua l'aerazione della miscela per 23 ore. Quindi si interrompe l'aerazione, si lasciano decantare i fanghi e si rimuove il surnatante.

I fanghi che rimangono nella camera di aerazione vengono quindi mescolati con un'altra aliquota del composto in esame e del liquame, e si ripete il ciclo.

La biodegradazione si ricava determinando la quantità di carbonio organico disciolto nel surnatante. Tale valore viene confrontato con quello trovato nel surnatante del controllo contenente soltanto liquame decantato.

Se si utilizza un metodo analitico specifico si possono determinare le variazioni di concentrazione della sostanza in esame dovute alla biodegradazione (biodegradabilità primaria).

1.5. Criteri di qualità

La riproducibilità di questo metodo basato sulla rimozione di carbonio organico disciolto non è stata ancora dimostrata. (Se si prende in considerazione la biodegradazione primaria si ottengono dati molto precisi per sostanze che siano estesamente degradate.)

La sensibilità del metodo dipende soprattutto dalla variabilità del bianco ed in minor misura dalla precisione della determinazione del carbonio organico disciolto e dalla quantità del composto in esame presente nel liquido all'inizio di ogni ciclo.

1.6. Descrizione del metodo

1.6.1. *Preparazioni*

Per ciascuna sostanza in esame e per i controlli si collega un numero sufficiente di unità di aerazione pulite (in alternativa si può usare l'unità originale per il saggio SCAS da 1,5 litri) con i tubi di presa dell'aria (figura 1). L'aria compressa inviata nelle unità di saggio, purificata con un filtro di cotone grezzo, deve essere esente da carbonio organico e satura di acqua per ridurre le perdite per evaporazione.

Da un impianto di trattamento a fanghi attivi adibito prevalentemente a liquami domestici si preleva un campione di liquido chiarificato, contenente da 1 a 4 g/l di solidi sospesi. Per ciascuna unità di aerazione occorrono circa 150 ml di liquido chiarificato.

Si preparano con acqua distillata le soluzioni madri della sostanza in esame; di solito è richiesta una concentrazione di 400 mg/l di carbonio organico che, se non ha luogo biodegradazione, corrisponde ad una concentrazione di sostanza in esame pari a 20 mg/l di carbonio all'inizio di ogni ciclo di aerazione.

Se la tossicità per i microorganismi lo consente si possono avere concentrazioni più elevate. Si misura la concentrazione di carbonio organico nelle soluzioni madri.

1.6.2. *Condizioni del saggio*

Il saggio va effettuato da 20 a 25 °C. Si utilizza un'elevata concentrazione di microorganismi aerobici (da 1 a 4 g/l di solidi sospesi) ed il periodo di ritenzione effettivo è di 36 ore. In genere, otto ore dopo l'avvio di ciascun ciclo di aerazione, il carbonio organico contenuto nei liquami immessi è ampiamente ossidato. Dopo ha inizio la respirazione endogena del fango che si manterrà per tutto il rimanente periodo di aerazione, durante il quale il solo substrato disponibile è la sostanza in esame a meno che non venga anch'essa metabolizzata rapidamente. Questi fattori, unitamente alla reinoculazione giornaliera del sistema (vedi paragrafo 1.4), nel caso in cui si usino come mezzo liquami domestici, crea condizioni estremamente favorevoli sia per l'acclimatazione, sia per ottenere elevati valori di biodegradazione.

1.6.3. *Esecuzione del saggio*

Si preleva un campione del liquido chiarificato da un idoneo impianto a fanghi attivi per il trattamento di liquami in prevalenza domestici oppure da un impianto di laboratorio e si mantiene in condizioni aerobiche sino all'impiego in laboratorio. Si riempie ciascuna unità di aerazione e l'unità di controllo con 150 ml (se si utilizza l'unità originale per il saggio SCAS, moltiplicare i volumi per 10) di liquido chiarificato e si avvia l'aerazione. Dopo 23 ore si interrompe l'aerazione e si lasciano decantare i fanghi per 45 minuti. Si apre, a turno, il rubinetto di ogni recipiente e si prelevano aliquote da 100 ml di surnatante. Si prepara, immediatamente prima dell'impiego, un campione di liquami domestici decantati e se ne aggiungono 100 ml al fango che rimane in ciascuna unità di aerazione. Si avvia nuovamente l'aerazione. A questo punto non si aggiunge la sostanza da esaminare e si alimentano giornalmente le unità con liquami domestici fino a quando si forma per decantazione un surnatante chiaro. In genere questa fase richiede al massimo due settimane e nel frattempo il carbonio organico disciolto nel surnatante raggiunge alla fine di ogni ciclo di aerazione un valore costante.

Terminata questa fase, i singoli fanghi sedimentati vengono mescolati tra loro e 50 ml di tale miscela vengono introdotti in ciascuna unità.

95 ml di liquame sedimentato e 5 ml di acqua vengono aggiunti all'unità di controllo, e 95 ml di liquame sedimentato più 5 ml della soluzione madre della sostanza in esame (400 mg/l) vengono aggiunti alle unità di saggio. Si riavvia l'aerazione e si protrae per 23 ore. Si lasciano quindi sedimentare i fanghi per 45 minuti, si preleva il surnatante e se ne analizza il contenuto di carbonio organico disciolto.

Le suddette operazioni di riempimento e di prelievo, vengono ripetute ogni giorno per tutta la durata del saggio.

Prima della sedimentazione può essere necessario pulire le pareti delle unità per evitare che si accumulino solidi al di sopra del livello del liquido. Per evitare contaminazioni incrociate si utilizza un raschiatore o una spazzola diversa per ciascuna unità.

Idealmente, il carbonio organico disciolto nei surnatanti dovrebbe essere determinato ogni giorno anche se si può consentire una minore frequenza delle analisi. Prima delle analisi i liquidi vengono filtrati mediante filtri a membrana con pori da 0,45 µm lavati oppure vengono centrifugati. I filtri a membrana sono idonei se durante la filtrazione non liberano carbonio organico né assorbono la sostanza in esame. Nella centrifuga la temperatura del campione non deve superare i 40 gradi centigradi.

La durata del saggio per i composti che mostrano una biodegradazione limitata o nulla non è fissata, ma l'esperienza suggerisce che la durata dovrebbe essere, in generale, di almeno 12 settimane, ma non più lunga di 26 settimane.

2. DATI E VALUTAZIONE

I valori del carbonio organico disciolto rilevati nei surnatanti delle unità di saggio e delle unità di controllo vengono riportati in grafico in funzione del tempo.

Con il procedere della biodegradazione i valori determinati nel saggio si avvicinano a quelli del controllo. Quando la differenza tra i due livelli si mantiene costante per oltre tre misurazioni consecutive, si esegue un numero di ulteriori misurazioni, tale da effettuare una elaborazione statistica dei dati e da calcolare la biodegradazione percentuale subita dalla sostanza in esame (D_{da}, oppure D_{mt}, vedi paragrafo 1.2).

3. RELAZIONE

3.1. Relazione sul saggio

Nella relazione sul saggio devono figurare, se possibile:

— tutte le informazioni sul tipo di liquame, sul tipo di unità usata e sui risultati sperimentali concernenti le sostanze esaminate, la sostanza di riferimento, se usata, ed il bianco,

— la temperatura,

— la curva di rimozione, nonché descrizione e metodo di calcolo relativi (vedi paragrafo 1.2),

— date e luogo di prelievo dei fanghi attivi e del liquame, stato di adattamento, concentrazione, ecc.,

— motivazioni scientifiche di eventuali modifiche del procedimento,

— firma e data.

3.2. Interpretazioni dei risultati

Dato che le sostanze esaminate con il presente metodo non sono facilmente biodegradabili, qualsiasi rimozione del DOC imputabile esclusivamente alla biodegradazione avviene in genere gradualmente nel corso di giorni o settimane, ad eccezione di quei casi in cui avviene una improvvisa acclimatazione indicata da una brusca scomparsa che si verifica dopo alcune settimane.

In ogni caso l'assorbimento chimico-fisico può a volte giocare un ruolo importante; ciò si verifica quando all'inizio della prova si riscontra una parziale o completa rimozione del DOC aggiunto. Ciò che accade successivamente, dipende da fattori quali il grado di assorbimento e la concentrazione di solidi sospesi nell'effluente di scarico. Di solito la differenza tra concentrazione del DOC nel controllo e nei surnatanti del saggio aumenta gradualmente rispetto al basso valore iniziale e tale differenza si mantiene quindi al nuovo valore per il resto della prova a meno che non si verifichi l'acclimatazione.

Se si vuole distinguere nel grafico la biodegradazione (o la parziale biodegradazione) dall'assorbimento, sono necessari ulteriori saggi. Questi possono essere effettuati in diversi modi: il più convincente è quello di usare il surnatante o i fanghi come inoculo in un saggio del dossier di base (preferibilmente il saggio respirometrico).

Le sostanze che in questo saggio mostrano un'elevata rimozione del DOC, non dovuta ad assorbimento, devono essere considerate potenzialmente biodegradabili. Un'eliminazione parziale non dovuta ad assorbimento indica che la sostanza è almeno in parte biodegradabile.

Valori bassi o nulli di rimozione del DOC possono essere dovuti ad un effetto inibente della sostanza in esame sui microorganismi, il che può anche essere evidenziato da lisi o da riduzione dei fanghi con formazione di surnatanti torbidi. Il saggio deve essere ripetuto a concentrazione più bassa della sostanza in esame.

Il ricorso a un metodo analitico specifico o alla marcatura della sostanza in esame con il ^{14}C può permettere una maggiore sensibilità. Nel caso di composti marcati con ^{14}C lo sviluppo di $^{14}CO_2$ confermerà che la biodegradazione ha avuto luogo.

Quando i risultati vengono presentati anche come biodegradazione primaria occorre dare, se possibile, una spiegazione del cambiamento di struttura chimica che causa la diminuzione di risposta della sostanza in esame.

Si deve dimostrare la validità del metodo analitico e riportare la risposta fornita dal bianco.

4. BIBLIOGRAFIA

(1) OCSE, Parigi 1981, *Linea Guida 302 B*, decisione C(81) 30 def. del Consiglio.

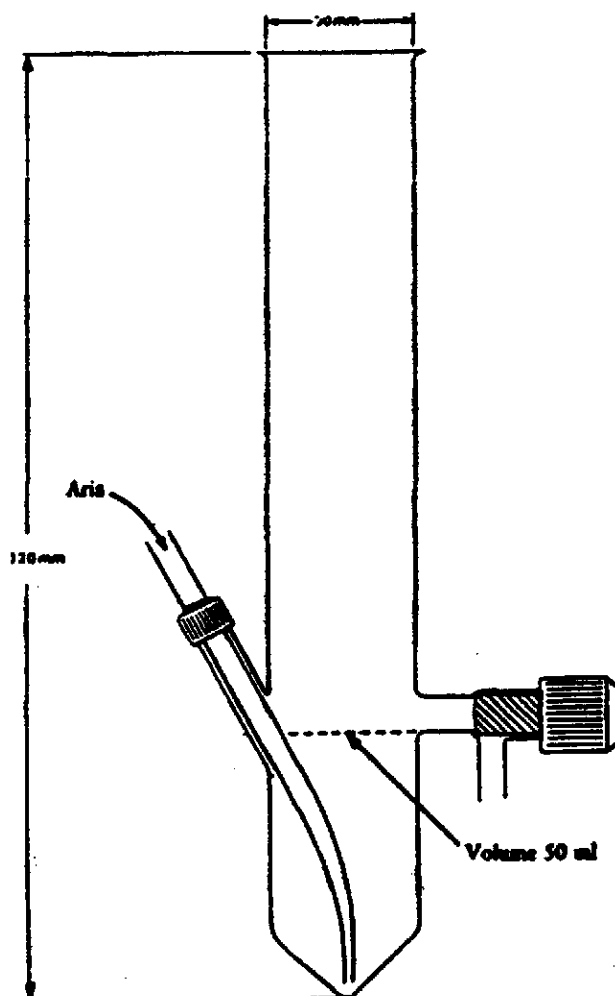
Appendice 1

Saggio SCAS: Esempio di risultati

Sostanza	C_T (mg/l)	$C_E - C_C$ (mg/l)	Biodegradazione percentuale D_{da}	Durata del saggio (giorni)
4-acetil aminobenzen sulfonato	17,2	2,0	85	40
Tetrapropilene benzen sulfonato	17,3	8,4	51,4	40
4-nitrofenolo	16,9	0,8	95,3	40
Glicol dietilenico	16,5	0,2	98,8	40
Anilina	16,9	1,7	95,9	40
Ciclopentano tetra carbossilato	17,9	3,2	81,1	120

Appendice 2

Esempio di apparecchiatura per il saggio

Figura 1

NOTE

AVVERTENZA:

Il testo delle note qui pubblicato è stato redatto ai sensi dell'art. 10, comma 3, del testo unico approvato con decreto del Presidente della Repubblica 28 dicembre 1985, n. 1092, al solo fine di facilitare la lettura delle disposizioni di legge alle quali è operato il rinvio. Restano invariati il valore e l'efficacia degli atti legislativi qui trascritti.

Note alle premesse:

— Il D.M. 3 dicembre 1985 (Classificazione e disciplina dell'imballaggio e dell'etichettatura delle sostanze pericolose, in attuazione delle direttive emanate dal Consiglio e dalla Commissione delle Comunità europee) è stato pubblicato nel suppl. ord. n. 2 alla *Gazzetta Ufficiale* n. 305 del 30 dicembre 1985.

— Il D.M. n. 555/1987 reca: «Modificazioni ed integrazioni al decreto ministeriale 3 dicembre 1985 sulla classificazione e la disciplina dell'imballaggio e dell'etichettatura delle sostanze pericolose, in attuazione della direttiva della commissione delle Comunità europee n. 86/431/CEE del 24 giugno 1986».

— La direttiva del Consiglio n. 87/432 è stata pubblicata nella «Gazzetta Ufficiale» delle Comunità europee n. L 239 del 21 agosto 1987.

— La direttiva della Commissione n. 87/302 è stata pubblicata nella «Gazzetta Ufficiale» delle Comunità europee n. L 133 del 30 maggio 1988.

— La direttiva della Commissione n. 88/490 è stata pubblicata nella «Gazzetta Ufficiale» delle Comunità europee n. L 259 del 19 settembre 1988.

Nota all'art. 2:

Per quanto concerne la direttiva della Commissione n. 87/302 v. nelle note alle premesse.

Nota all'art. 3:

Il testo dell'art. 6 della legge n. 256/1984 (Classificazione e disciplina dell'imballaggio e dell'etichettatura delle sostanze e dei preparati pericolosi) è il seguente:

«Art. 6. — Si provvederà con uno o più decreti da emanarsi nei modi di cui all'articolo 3 alla determinazione:

dei simboli e delle indicazioni di pericolo di cui al punto 3 dell'articolo 5;

della natura dei rischi specifici di cui al punto 4 dell'articolo 5;

degli eventuali consigli di prudenza di cui al punto 5 dell'articolo 5.

I decreti previsti dall'articolo 3 e dal comma primo del presente articolo possono contenere la fissazione di un termine non superiore a 12 mesi per lo smaltimento delle sostanze e dei preparati già immessi sul mercato non conformi nell'imballaggio e nell'etichettatura alle disposizioni della presente legge».

90A0188

FRANCESCO NIGRO, *direttore*

FRANCESCO NOCITA, *redattore*
ALFONSO ANDRIANI, *vice redattore*

(2651315) Roma - Istituto Poligrafico e Zecca dello Stato - S.

MODALITÀ PER LA VENDITA

La «Gazzetta Ufficiale» e tutte le altre pubblicazioni ufficiali sono in vendita al pubblico:

— presso l'Agenzia dell'Istituto Poligrafico e Zecca dello Stato in Roma, piazza G. Verdi, 10;

— presso le Concessionarie speciali di:
BARI, Libreria Laterza S.p.a., via Sparano, 134 - BOLOGNA, Libreria Ceruti, piazza dei Tribunali, 5/F - FIRENZE, Libreria Pirola (Etruria S.a.s.), via Cavour, 46/r - GENOVA, Libreria Baldaro, via XII Ottobre, 172/r - MILANO, Libreria concessionaria «Istituto Poligrafico e Zecca dello Stato» S.r.l., Galleria Vittorio Emanuele, 3 - NAPOLI, Libreria Italiana, via Chiaia, 5 - PALERMO, Libreria Flaccovio SF, via Ruggero Settimo, 37 - ROMA, Libreria Il Tritone, via del Tritone, 61/A - TORINO, SO.CE.DI. S.r.l., via Roma, 80;

— presso le Librerie depositarie indicate nella pagina precedente.

Le richieste per corrispondenza devono essere inviate all'Istituto Poligrafico e Zecca dello Stato - Direzione Commerciale - Piazza G. Verdi, 10 - 00100 Roma, versando l'importo, maggiorato delle spese di spedizione, a mezzo del c/c postale n. 387001. Le inserzioni, come da norme riportate nella testata della parte seconda, si ricevono in Roma (Ufficio inserzioni - Piazza G. Verdi, 10). Le suddette librerie concessionarie speciali possono accettare solamente gli avvisi consegnati a mano e accompagnati dal relativo importo.

PREZZI E CONDIZIONI DI ABBONAMENTO - 1990

ALLA PARTE PRIMA - LEGISLATIVA

Ogni tipo di abbonamento comprende gli indici mensili

Tipo A - Abbonamento ai fascicoli della serie generale, inclusi i supplementi ordinari:		
- annuale	L.	296.000
- semestrale	L.	160.000
Tipo B - Abbonamento ai fascicoli della serie speciale destinata agli atti dei giudizi davanti alla Corte costituzionale:		
- annuale	L.	52.000
- semestrale	L.	36.000
Tipo C - Abbonamento ai fascicoli della serie speciale destinata agli atti delle Comunità europee:		
- annuale	L.	166.000
- semestrale	L.	88.000
Tipo D - Abbonamento ai fascicoli della serie speciale destinata alle leggi ed ai regolamenti regionali:		
- annuale	L.	52.000
- semestrale	L.	36.000
Tipo E - Abbonamento ai fascicoli della serie speciale destinata ai concorsi indetti dallo Stato e dalle altre pubbliche amministrazioni:		
- annuale	L.	166.000
- semestrale	L.	90.000
Tipo F - Abbonamento ai fascicoli della serie generale, inclusi i supplementi ordinari, e i fascicoli delle quattro serie speciali:		
- annuale	L.	556.000
- semestrale	L.	300.000

Integrando il versamento relativo al tipo di abbonamento della Gazzetta Ufficiale, parte prima, prescelto con la somma di L. 50.000, si avrà diritto a ricevere l'indice repertorio annuale cronologico per materie 1990.

Prezzo di vendita di un fascicolo della *serie generale*	L.	1.000
Prezzo di vendita di un fascicolo delle *serie speciali I, II e III*, ogni 16 pagine o frazione	L.	1.000
Prezzo di vendita di un fascicolo della *IV serie speciale «Concorsi»*	L.	2.400
Supplementi ordinari per la vendita a fascicoli separati, ogni 16 pagine o frazione	L.	1.100
Supplementi straordinari per la vendita a fascicoli separati, ogni 16 pagine o frazione	L.	1.100

Supplemento straordinario «Bollettino delle estrazioni»

Abbonamento annuale	L.	100.000
Prezzo di vendita di un fascicolo ogni 16 pagine o frazione	L.	1.100

Supplemento straordinario «Conto riassuntivo del Tesoro»

Abbonamento annuale	L.	60.000
Prezzo di vendita di un fascicolo	L.	6.000

Gazzetta Ufficiale su MICROFICHES
(Serie generale - Supplementi ordinari - Serie speciali)

		Prezzi di vendita Italia	Estero
Invio settimanale	N. 6 microfiches contenenti 6 numeri di Gazzetta Ufficiale fino a 96 pagine cadauna	L. 6.000	6.000
	Per ogni 96 pagine successive o frazione riferite ad una sola Gazzetta	L. 1.000	1.000
	Spese per imballaggio e spedizione raccomandata	L. 4.000	6.000

N.B. — Le microfiches sono disponibili dal 1° gennaio 1983.

ALLA PARTE SECONDA - INSERZIONI

Abbonamento annuale	L.	255.000
Abbonamento semestrale	L.	155.000
Prezzo di vendita di un fascicolo, ogni 16 pagine o frazione	L.	1.200

I prezzi di vendita, in abbonamento ed a fascicoli separati, per l'estero, nonché quelli di vendita dei fascicoli delle annate arretrate, compresi i fascicoli dei supplementi ordinari e straordinari, sono raddoppiati.

L'importo degli abbonamenti deve essere versato sul c/c postale n. 387001 intestato all'Istituto Poligrafico e Zecca dello Stato. L'invio dei fascicoli disguidati, che devono essere richiesti all'Amministrazione entro 30 giorni dalla data di pubblicazione, è subordinato alla trasmissione di una fascetta del relativo abbonamento.

Per informazioni o prenotazioni rivolgersi all'Istituto Poligrafico e Zecca dello Stato:

- abbonamenti . . . . ☎ (06) 85082149/85082221
- vendita pubblicazioni . . . . . ☎ (06) 85082150/85082276
- inserzioni . . . . ☎ (06) 85082145/85082189

N. B. — ***Gli abbonamenti annuali hanno decorrenza dal 1° gennaio al 31 dicembre 1990, mentre i semestrali dal 1° gennaio al 30 giugno 1990 e dal 1° luglio al 31 dicembre 1990.***